



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**EFFECTOS DE LA DEPLECIÓN ANDROGÉNICA
SOBRE LA DENSIDAD MINERAL Y LA CALIDAD
ÓSEA EN RATAS MACHO ADULTAS
Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
HORMONA PARATIROIDEA HUMANA**

Trabajo que para optar al grado de
Doctora en Medicina presenta

Elena Martínez Gimeno
Licenciada en Medicina

Directores: Dra. Concepción de la Piedra Gordo
Dr. Manuel Díaz Curiel

Madrid, 2012

Dra. Concepción de la Piedra Gordo, Jefe Asociado del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz y **Dr. Manuel Díaz Curiel**, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe Asociado del Departamento de Medicina Interna del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz,

INFORMAN:

Que D^a **Elena Martínez Gimeno**, licenciada en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: **“Efectos de la depleción androgénica sobre la densidad mineral y la calidad ósea en ratas macho adultas, y respuesta al tratamiento con hormona paratiroidea humana”**.

Revisado el presente trabajo, estiman que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a 18 de abril de dos mil doce.

Fdo. Dr. D. Manuel Díaz Curiel

Fdo. Dra. Dña. Concepción de la Piedra

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Bioquímica Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz.

La financiación del proyecto se ha realizado mediante una ayuda a la investigación otorgada por la compañía Nycomed Pharma.

A Alejandro, Paula y Ales, mi familia.

Agradecimientos

La investigación ha sido una de mis pasiones desde que empecé a estudiar Medicina. Aunque me he dedicado profesionalmente a la investigación biomédica desde hace más de 16 años, es ahora cuando gracias al tesón y el empuje de Manuel Díaz Curiel, me propongo a terminar y presentar mi tesis doctoral.

Por tanto, el listado de agradecimientos debe empezar por mis directores de tesis, los Dres. Manuel Díaz Curiel y Concepción de la Piedra Gordo, por apoyarme incondicionalmente y conseguir que, además de atender obligaciones laborales y personales, pudiese emprender este proyecto y llevarlo a buen puerto.

A mis colegas, que han formado y forman parte de los Departamentos Médicos en Nycomed Pharma y Pfizer España, por compartir el objetivo de que la industria farmacéutica pueda y deba investigar en España con los más altos estándares éticos y de calidad, y por contribuir a mi formación para que fuera capaz de alcanzarlos.

A José Ramón Caeiro y David Guede, por introducirme en el fascinante y complejo mundo de la resistencia ósea y la física de materiales.

A Mercedes Montero y Marta Martín, por enseñarme las técnicas quirúrgicas que se aplican en el modelo experimental, y por cuidar tan bien a nuestros animales en el laboratorio experimental de la Fundación Jiménez Díaz.

A mis hijos, a mis padres, hermanos y amigos, que entendieron que obtener el doctorado en Medicina es algo más que una línea en el currículum, y que el esfuerzo dedicado merecía la pena. Gracias por echarme un cable en las tareas diarias y ser generosos, cediendo a la ciencia algunos ratos de nuestro tiempo compartido, para que pudiera trabajar en este proyecto.

Y por último, a Alejandro. Gracias por tu confianza y tu apoyo, en buenos y malos momentos has sido mi guía.

Abreviaturas

BGP: Osteocalcina, Bone-Gla Protein

BMU: Unidad de remodelado óseo

BSAP: Fosfatasa alcalina específica de hueso (FAEH)

BSU: Unidades estructurales óseas

BV/TV: Fracción volumétrica ósea

BV: Volumen óseo

CTX: Telopéptido C-terminal de la cadena α del colágeno I (CrossLaps)

CFU-GM: Células formadoras de granulocitos y macrófagos

DA: Grado de anisotropía

DE: Desviación estándar

DXA: Absorciometría de rayos X de doble energía

DMO: Densidad mineral ósea

ELISA: Enzimo-inmuno ensayo

FA: Fosfatasa alcalina

FDA: Agencia americana evaluación de medicamentos (*Food & Drug Administration*)

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos

IL-6: Interleukina 6

IGF: Factor de crecimiento insulínico

δ ult: Desplazamiento máximo hasta la fractura

ϵ_{ult} : Deformación máxima hasta la fractura

μ CT: Microtomografía computerizada

μ g: Microgramo

μ m: Micra

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

mm: Milímetros

MMI: Momento polar de inercia

MB: Megabytes

NTX: Telopéptidos aminoterminales del colágeno I unidos por puentes de piridolina

OPG: Osteoprotegerina

OQX: Orquidectomizada

OVX: Ovariectomizada

PICP: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I

PINP: Propéptido aminoterminal del procolágeno I

PTH: Hormona paratiroidea

PTHr1: Receptor 1 de la hormona paratiroidea

RANK: Receptor activador del factor nuclear kappa B

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B

ROI: Región de interés

s.c.: Vía subcutánea

SHAM: Intervención quirúrgica simulada

SMI: Índice estructural del modelo

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.Pf: Factor del patrón trabecular

Tb.Sp: Separación trabecular

Tb.Th: Grosor trabecular

σ_{ult} : Tensión máxima hasta la fractura

TGF β : Factor de crecimiento tumoral beta

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente

u: Dureza

U: Trabajo de rotura hasta la fractura

VOI: Volumen de interés

Wnt: Proteínas de señal. Sistema estimulador de la formación de osteoblastos

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Morfología del tejido óseo	7
1.1.1. <i>La matriz ósea</i>	8
1.1.1.1. Colágeno	8
1.1.1.2. Otras proteínas de matriz	9
1.1.2. <i>Sales minerales</i>	10
1.1.3. <i>Componente celular</i>	10
1.1.3.1. Osteoblastos y osteocitos	10
1.1.3.2. Osteoclastos	11
1.2. Tipos de hueso	13
1.3. Recambio óseo	14
1.3.1. <i>Modelado óseo</i>	14
1.3.2. <i>Remodelado óseo</i>	14
1.4. Regulación del remodelado óseo: factores humorales	16
1.4.1. <i>Hormona paratiroidea (PTH)</i>	17
1.4.2. <i>Calcitriol</i>	17
1.4.3. <i>Calcitonina</i>	17
1.4.4. <i>Hormonas sexuales</i>	18
1.5. Sistema osteoprotegerina (OPG) /ligando de RANK (RANKL)	19
1.6. Marcadores del remodelado óseo	21
1.6.1. <i>Osteocalcina</i>	23
1.6.2. <i>PINP</i>	23
1.6.3. <i>Isoenzima 5b de la TRAP</i>	23
1.6.4. <i>CTX</i>	24
1.7. Masa ósea y calidad ósea	24
1.8. Medidas de la cantidad: Densidad mineral ósea	25
1.9. Métodos para determinar DMO	26
1.9.1. <i>Absorciometría de rayos X de doble energía</i>	26
1.9.2. <i>Otros métodos</i>	27
1.9.2.1. Tomografía computarizada cuantitativa	27
1.9.2.2. Ultrasonografía	28

1.10. Medidas de la calidad: Características estructurales óseas	28
1.11. Evaluación de la estructura ósea	31
1.11.1. <i>Histomorfometría</i>	31
1.11.2. <i>Microtomografía ósea</i>	31
1.11.2.1. <i>Parámetros de medida</i>	32
1.12. Biomecánica ósea	37
1.13. Osteoporosis	39
1.13.1. <i>Definición</i>	39
1.13.2. <i>Tipos de osteoporosis</i>	40
1.13.3. <i>Tratamiento de la osteoporosis</i>	41
1.13.4. <i>Osteoformadores</i>	42
1.13.5. <i>PTH recombinante humana de cadena completa (PTH 1-84)</i>	45
1.13.6. <i>Osteoformadores en la OP del varón</i>	47
1.14. Modelos experimentales de osteoporosis	47
1.15. Resumen y comentarios a la introducción	48
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo 1	53
2.2. Objetivo 2	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1. Diseño experimental	57
3.2. Preparación del tratamiento	58
3.4. Análisis de la microarquitectura	60
3.4.1. <i>Reconstrucción de imágenes</i>	61
3.4.2. <i>Selección del volumen de interés y región de interés</i>	61
3.4.3. <i>Análisis de la región trabecular</i>	62
3.4.4. <i>Análisis de la región cortical</i>	63
3.5. Análisis de las propiedades biomecánicas	63
3.6. Determinaciones de los marcadores de remodelado óseo	65
3.6.1. <i>Osteocalcina</i>	65
3.6.2. <i>CTX</i>	66
3.6.3. <i>Isoenzima 5b de la TRAP</i>	67
3.7. Análisis Estadístico	67
4. RESULTADOS	71
4.1. Cambios en el peso de los animales tras la orquidectomía	71
4.1. Cambios en la cantidad ósea	72
4.2. Cambios en la calidad ósea	73
4.2.1. <i>Microarquitectura trabecular</i>	73
4.2.2. <i>Microarquitectura ósea cortical</i>	76

4.2.3.	<i>Propiedades biomecánicas del hueso (ensayos de flexión)</i>	78
4.2.4.	<i>Cambios en los marcadores de remodelado óseo</i>	79
5.	DISCUSIÓN	83
6.	CONCLUSIONES	93
7.	BIBLIOGRAFÍA	95

INTRODUCCIÓN



1. Introducción

1.1. Morfología del tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo especializado que, junto con el cartílago, forma el sistema esquelético. El esqueleto constituye aproximadamente el 10-15% del peso corporal [1]. El tejido óseo tiene tres funciones principales: **mecánica** (da forma al organismo y permite el movimiento, siendo zona de unión de los músculos), **protectora** (de los órganos vitales y de la médula ósea) y **metabólica** (reservorio de iones, principalmente de calcio y fósforo [2]).

Embriológicamente, la formación de un organismo tridimensional a partir de la información del genoma incluye la citodiferenciación y la morfogénesis. El hueso es el único tejido del organismo que se regenera de manera completa tras una lesión (fractura). Las células que forman el esqueleto óseo derivan de tres estirpes [3]:

- Las células de la cresta neural, que dan lugar a los derivados de los arcos faríngeos para formar el esqueleto craneofacial.

- El mesodermo paraxial, responsable del esqueleto craneofacial, forma la mayor parte del esqueleto axial, a través de la división esclerotómica de los somitas.

- Las células del mesodermo de la placa lateral, a partir de las cuales se desarrolla el esqueleto de las extremidades.

En todos los tejidos de sostén o conjuntivos hay dos componentes esenciales: las células y el material extracelular o matriz ósea [4]. El componente celular supone tan solo un 2% del tejido. El material extracelular es el responsable de las propiedades físicas de los distintos tejidos. El tejido óseo está básicamente formado por una matriz de proteínas (35%), minerales (65%) y células que crean y destruyen y constantemente esa matriz para mantener su integridad (Fig. 1). La característica especial del tejido óseo es que la matriz orgánica sufre un proceso de mineralización que le confiere su dureza particular.

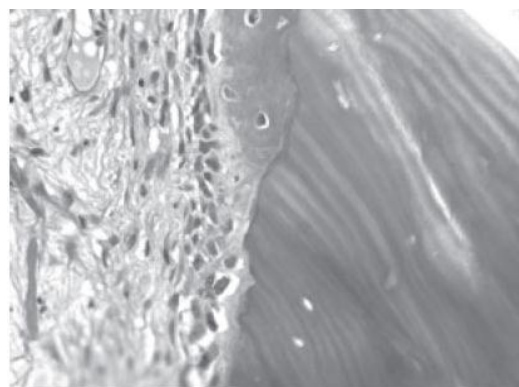


Figura 1: Ribete osteoblástico con aposición de osteoide neoformado sobre trabécula desvitalizada

La **matriz orgánica** está formada por fibras de colágeno tipo I (90 % del total proteico), cuya organización dictamina la superestructura del hueso, pero también por proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que cabe destacar la os-

teocalcina, osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas (10% restante), probablemente con funciones relacionadas con la comunicación célula-matriz; también se pueden encontrar glicosaminoglicanos y lípidos.

El **componente mineral** está formada fundamentalmente por iones de fosfato cálcico depositados en forma de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ entre las fibras de colágeno, y en menor proporción por iones HCO_3^- , Mg^{2+} , citratos, Na^+ , K^+ , sulfatos, etc.

El **componente celular** está formado principalmente por los osteoblastos o células formadoras de hueso, y por los osteoclastos o células destructoras de hueso. Existe un tercer tipo celular que deriva de la diferenciación de los osteoblastos, llamados osteocitos. Al estar el hueso en contacto directo con la médula ósea e infiltrado de vasos sanguíneos, las células óseas se encuentran bajo la acción directa de un gran número de factores locales y de hormonas sistémicas.

1.1.1. La matriz ósea

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión, mientras que las sales minerales confieren du-

reza, rigidez y resistencia a la compresión. La matriz del hueso se compone de colágeno, otras proteínas de matriz y minerales.

1.1.1.1. Colágeno

El colágeno es el principal componente orgánico de la matriz ósea extracelular. Se trata de una proteína fibrilar muy reticulada que, por medio de su estructura tridimensional (parecida a una cuerda), proporciona al hueso resistencia frente a la tensión.

Se conocen al menos doce tipos de colágeno, numerados del I al XII. La molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas α_1 y una cadena estructuralmente similar, pero genéticamente diferente, α_2 [4, 5]. El colágeno tipo I es sintetizado por los osteoblastos, los odontoblastos y los fibroblastos [5], en forma de precursor: el procolágeno tipo I (Fig. 2). El procolágeno tipo I contiene una larga hebra de triple hélice que termina en los llamados telopéptidos, cada uno de los cuales finaliza en un grupo $-\text{COOH}$ (carboxi) o $-\text{NH}_2$ (amino) terminal, que son pequeños segmentos que ya no tienen estructura superhelicoidal. Tras ser sintetizado por las células, el procolágeno tipo I es liberado al exterior celular, donde se produce la escisión de sus extremos amino- y carboxi- terminales por acción de peptidasas específicas.

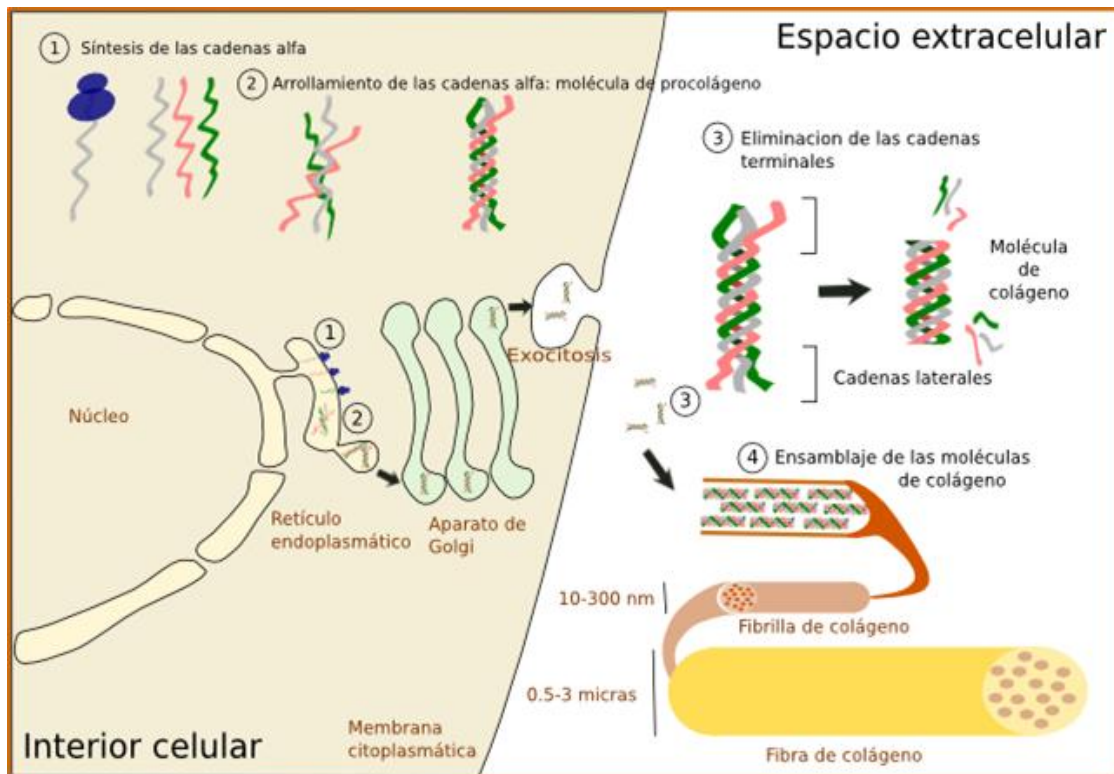


Figura 2: Biogénesis del colágeno

Cuando en el organismo se genera matriz ósea, se pueden detectar en el suero de los pacientes los dos péptidos correspondientes a los extremos del procolágeno, denominados propéptido amino-terminal del procolágeno I (PINP), de aproximadamente 25 KDa, y propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP), de aproximadamente 35 KDa. Estos péptidos se utilizan en clínica e investigación como marcadores bioquímicos de formación ósea. Una vez escindidos los fragmentos anteriormente nombrados, las moléculas de colágeno se acoplan una al lado de otra mediante una reacción catalizada por una enzima específica, la lisil-oxidasa, que une la hidroxiprolina de una cadena con un res- to de lisina de otra cadena, formando las fibras que conforman la matriz ósea [7,8].

1.1.1.2. Otras proteínas de matriz

El 10% de la matriz ósea está formada por proteínas tales como osteocalcina y osteonectina. La osteocalcina es la proteína no colágena que se encuentra en mayor cantidad en el hueso [9]. Su concentración en suero refleja la actividad osteoblástica, y su incremento en se asocia a la mineralización del hueso, pero las concentraciones no son siempre paralelas a las de la fosfatasa alcalina ósea. La disminución del aclaramien- to renal puede elevar las concentraciones séricas de osteocalcina. La osteocalcina en sangre está presente en muy variadas for- mas que derivan de la fragmentación de la molécula intacta. Aumenta durante el cre- cimiento, en el hiperparatirodismo primario y secundario, en el hipertiroidismo, en la

insuficiencia renal y en la osteoporosis, patología que estudiaremos en esta tesis. Disminuye en el hipotiroidismo y en el tratamiento con corticosteroides.

1.1.2. Sales minerales

La matriz ósea contiene abundantes sales minerales. El fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2]$ interactúa con el hidróxido de calcio $[\text{Ca} (\text{OH})_2]$ para formar cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, lo que supone casi dos tercios del peso de hueso. Estos cristales incorporan también otras sales de calcio tales como carbonato de calcio, e iones como sodio, magnesio y fluoruro, con objeto de aumentar la resistencia del hueso. Todas estas sales se depositan en la retícula formada por las fibras de colágeno, adquiriendo la misma disposición en el espacio que éstas, proceso denominado mineralización. El proceso está regulado por los osteoblastos y está mediado por la fosfatasa alcalina ósea, necesaria para hidrolizar los ésteres de fosfato y poner en contacto el fosfato con el calcio para formar los cristales de hidroxiapatita.

En la madurez, el cuerpo adulto contiene aproximadamente 1300 g de calcio, la mayor parte localizado en los huesos [10]. La mineralización cálcica del hueso es esencial para su extensión durante el crecimiento y para proporcionar resistencia al tejido.

1.1.3. Componente celular

Las células óseas, es decir, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, protagonizan el modelado y remodelado del esqueleto a través de las funciones específicas que llevan a cabo.

1.1.3.1. Osteoblastos y osteocitos

Los osteoblastos (Fig. 3) son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Su función principal es la síntesis y deposición de las proteínas de la matriz del hueso (principalmente del colágeno tipo I), y de su posterior mineralización.

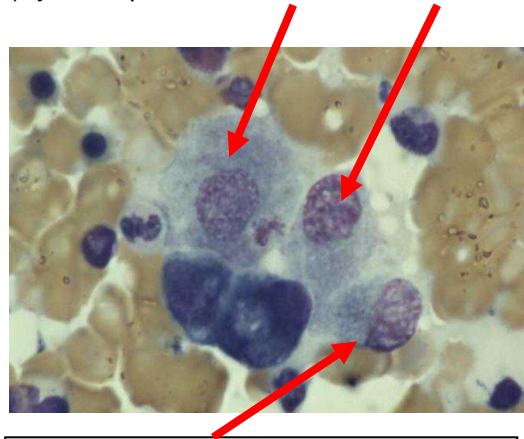


Figura 3: Osteoblastos (www.recursos.cnice.mec.es)

Se originan a partir de células pluripotenciales mesenquimales localizadas en la médula ósea, que ante la presencia de factores locales proliferan y se diferencian en preosteoblastos y en osteoblastos maduros [3, 11] .

La membrana de los osteoblastos posee receptores para diferentes hormonas: hormona paratiroidea (PTH), insulina,

progesterona y hormona del crecimiento, así como para moléculas de adhesión (integrinas) y para diversas citoquinas [12-14]. Estas células también presentan receptores nucleares para los estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y vitamina D₃.

Durante el proceso de formación ósea, los osteoblastos quedan incorporados en la matriz ósea y maduran, transformándose en osteocitos, o bien pueden convertirse en células de revestimiento (*lining cells*) [11]. Los osteocitos tienen morfología estrellada, esto es, poseen ramificaciones (*gap junctions*) que se extienden por los canalículos de la matriz mineralizada y que comunican con otros osteocitos y con las células de revestimiento.

Hasta hace algunos años no se había considerado que los osteocitos pudieran tener funciones clave en el metabolismo óseo, pero en estudios recientes se ha descrito que los osteocitos son capaces de recibir estímulos mecánicos y transformarlos en señales químicas, para transmitirlos a las células de revestimiento con el fin de modular de manera local el modelado y remodelado óseos [11].

1.1.3.2. Osteoclastos

Los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea (Fig. 4). Realizan funciones opuestas a los osteo-

blastos: disolución del mineral óseo y degradación de la matriz.

Derivan de células hematopoyéticas mononucleares de la médula ósea, concretamente de las células formadoras de granulocitos y macrófagos (CFU-GM). Los precursores osteoclásticos mononucleares circulan por la sangre y, encontrándose en la superficie del endostio y estando en presencia de osteoblastos, proliferan y se fusionan formando células multinucleadas gigantes [15,16].

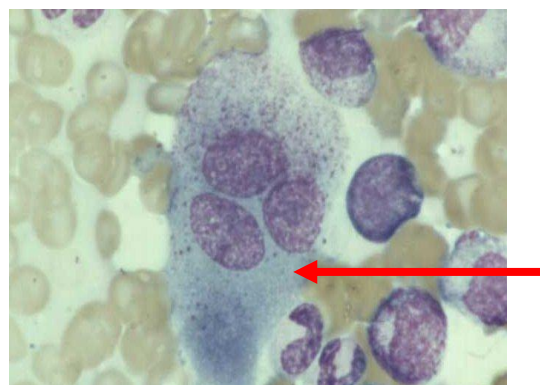


Figura 4: Osteoclasto (www.recursos.cnice.mec.es)

Los osteoclastos presentan un citoplasma acidófilo rico en anhidrasa carbónica, fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y un gran número de vacuolas con enzimas lisosomales y collagenasa, responsables de la disolución del hueso [15]. La membrana plasmática del osteoclasto tiene la peculiaridad de tener un área llamada "borde en cepillo" formada por numerosas invaginaciones, que se une íntimamente a la superficie del hueso, formando un espacio llamado laguna de Howship.

Las enzimas lisosomales (TRAP, colagenasa y catepsina K) se secretan a través del borde en cepillo hacia la laguna de Howship, donde las bombas de protones presentes en la membrana plasmática crean un ambiente ácido que disuelve los constituyentes de la matriz ósea [11,15].

En la regulación de la diferenciación y la actividad osteoclástica intervienen un gran número de factores que actúan principalmente a través de los receptores superficiales de los osteoclastos. Los osteoblastos regulan la diferenciación y la actividad de los osteoclastos mediante el sistema RANK/RANKL/OPG, que se analizará posteriormente con más profundidad. De esta manera, ambos tipos celulares, están directamente implicados en el remodelado óseo y en la homeostasis del calcio y del fosfato [11]. (Fig. 5 a y b)

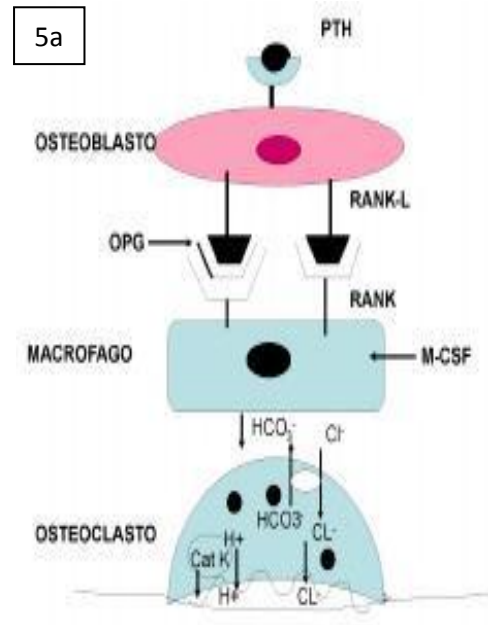
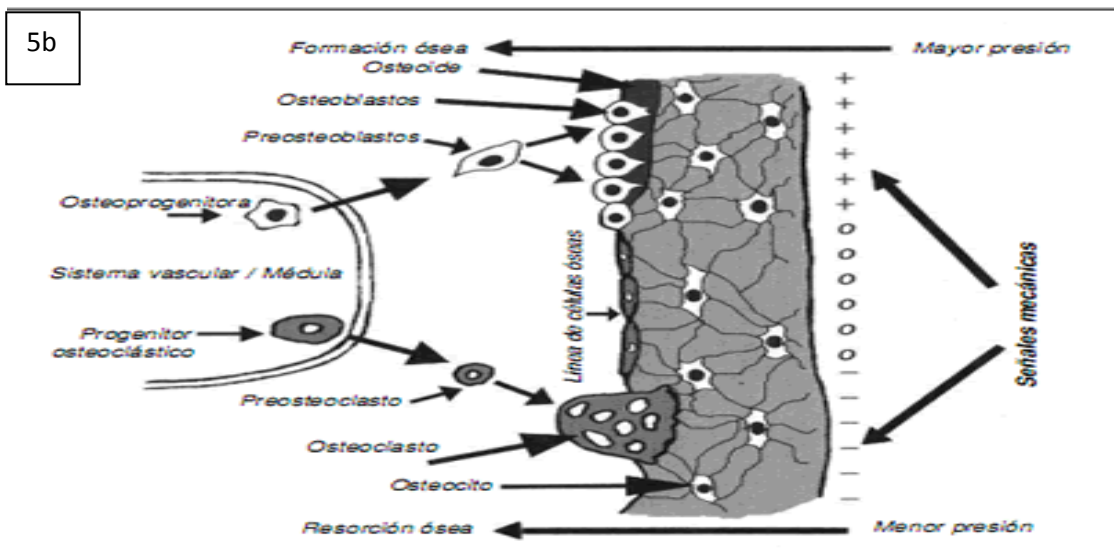


Figura 5: 5a: Interacciones entre osteoblasto y osteoclasto. PTH estimula las células del estroma y los osteoblastos expresan M-CSF y RANK-L, el cual se une al RANK estimulando la osteoclastogénesis. La osteoprotegerina (OPG) bloquea los efectos del RANKL sobre el RANK de los macrófagos. **5b:** Señalización y diferenciación osteoblastos y osteoclastos. Modificado de Teitelbaum SL. Science 2000; 289: 1504-1508.



1.2. Tipos de hueso

Según su estructura, el tejido óseo se clasifica en hueso cortical y hueso trabecular.

-Hueso cortical o compacto: Se presenta como una masa sólida y continua de tejido óseo, en la cual los espacios únicamente pueden percibirse al microscopio. Se ordena en laminillas óseas, las cuales se pueden disponer de manera paralela (hueso compacto laminar) o de manera concéntrica alrededor de un canal (hueso compacto de tipo osteónico). Por este canal discurren vasos sanguíneos y nervios, y junto con las laminillas óseas concéntricas y los osteocitos, dispuestos entre las laminillas, forman en conjunto denominado **osteona** o sistema de Havers (Fig. 6). Los canales de Havers de osteonas cercanas están conectados mediante canales transversales denominados canales de Volkmann. Del orden de 4 a 20 laminillas óseas se disponen alrededor de un canal de Havers. Los osteocitos se encuentran en unos espacios localizados en las laminillas óseas denominados lagunas. De estas lagunas salen pequeños conductos denominados canalículos, por donde los osteocitos emiten prolongaciones celulares. Los canalículos se abren a los canales de Havers por donde viajan los vasos sanguíneos, y desde donde los osteocitos obtienen los nutrientes (Fig. 8).



Figura 6: Osteonas en hueso cortical. El color azul indica reemplazamiento dinámico de la osteona por remodelación. (Reproducido de L. Mosekilde)

-Hueso trabecular o esponjoso: Está constituido por un retículo tridimensional de espículas o trabéculas de tejido óseo, que delimitan un sistema laberíntico de espacios intercomunicantes ocupados por la médula ósea (Fig. 7). Este tipo de hueso posee grandes espacios denominados cavidades vasculares, ocupados por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. Estas cavidades están delimitadas por trabéculas óseas, en las cuales las fibras de colágeno pueden estar dispuestas de manera entrecruzada (hueso trabecular no laminar), o bien ordenadas en laminillas óseas (hueso trabecular laminar). Generalmente, durante la osteogénesis se forma primero un hueso trabecular no laminar, denominado primario, que posteriormente es sustituido por un hueso secundario o trabecular laminar. Este último se encuentra por lo general en el interior de los huesos, como el interior de la epífisis o en la cabeza de los huesos largos, siempre rodeado por hueso compacto.



Figura 7: Fémur proximal, observado desde el entramado trabecular correspondiente al triángulo de Ward (Reproducido de L. Mosekilde)

Las osteonas y las trabéculas se denominan unidades estructurales óseas (*bone structural units*, BSU). La distribución del hueso cortical o trabecular varía dependiendo del tipo de hueso. Así el tejido trabecular abunda en la epífisis de los huesos largos, en los huesos cortos y en la porción central de los huesos planos. El hueso cortical abunda en las diáfisis de los huesos largos y en la lámina de los huesos planos.

1.3. Recambio óseo

El hueso está en constante renovación a lo largo de la vida, en que tanto el hueso trabecular como el cortical pasan

dos procesos fisiológicos: modelado y remodelado [17].

1.3.1. Modelado óseo

Permite la formación de hueso nuevo, con lo que puede modificarse la forma y resistencia del esqueleto. Este proceso tiene lugar principalmente durante la infancia/adolescencia, a medida que los huesos crecen y se desarrollan. En la edad adulta, el modelado óseo es el proceso responsable de la formación de hueso nuevo y del aumento en el tamaño de las vértebras [18].

1.3.2. Remodelado óseo

Este proceso incluye la resorción ósea seguida de la formación de hueso nuevo, y es un mecanismo por el que el hueso se repara a sí mismo y se adapta a las necesidades mecánicas. Es el proceso predominante en el adulto, en que el tamaño del esqueleto no se modifica. El hueso se destruye y se forma en una secuencia controlada por señalización bioquímica: el

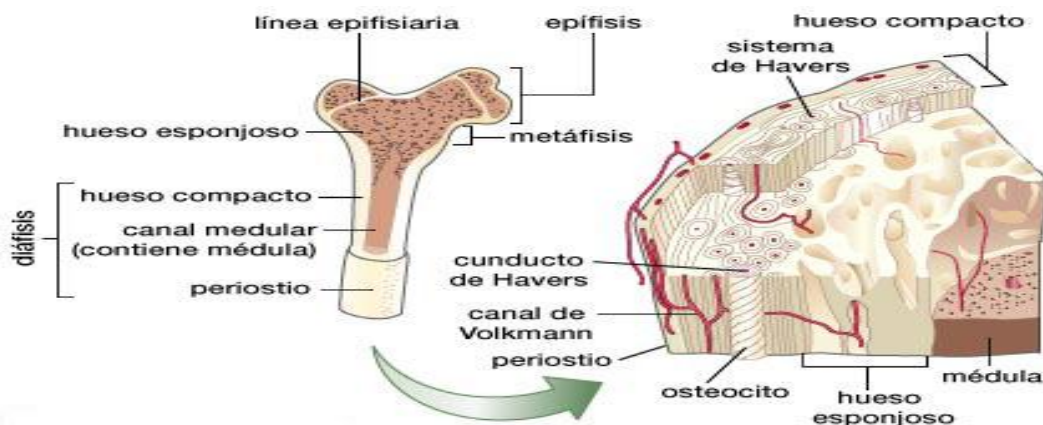


Figura 8: Estructura y tipos de hueso. <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Hueso>

hueso viejo es destruido y sustituido por hueso nuevo durante la vida adulta, manteniéndose en un equilibrio dinámico que denominamos “acoplamiento”, en el que formación y destrucción o resorción son equivalentes, resultando en una cantidad de masa ósea neta constante. El proceso de remodelación tiene lugar en ciertas zonas a lo largo de la superficie del hueso, llamadas unidades de remodelado óseo (BMU). Cada año se remodela el 2-10% del esqueleto, siendo el 80% de la actividad de recambio óseo en el hueso trabecular, mientras que el 20% del remodelado ocurre en el hueso cortical [18].

La función principal del remodelado es el mantenimiento y adecuación de las características mecánicas del hueso, mediante la continua sustitución de tejido óseo dañado (presencia de microfracturas) por tejido nuevo, y mediante la adaptación de la organización espacial del hueso recién sintetizado a la sobrecarga de cada momento, siendo igualmente importante el mantenimiento de la homeostasis mineral del organismo [19]. Es un fenómeno continuo de reparación y renovación ósea, que transcurre en cuatro etapas: fase inicial o de activación, fase de resorción, fase intermedia, fase de formación y finalmente, fase de mineralización ósea [11]. (Fig. 9)

Fase inicial o de activación. La activación comienza con el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos. Dichos

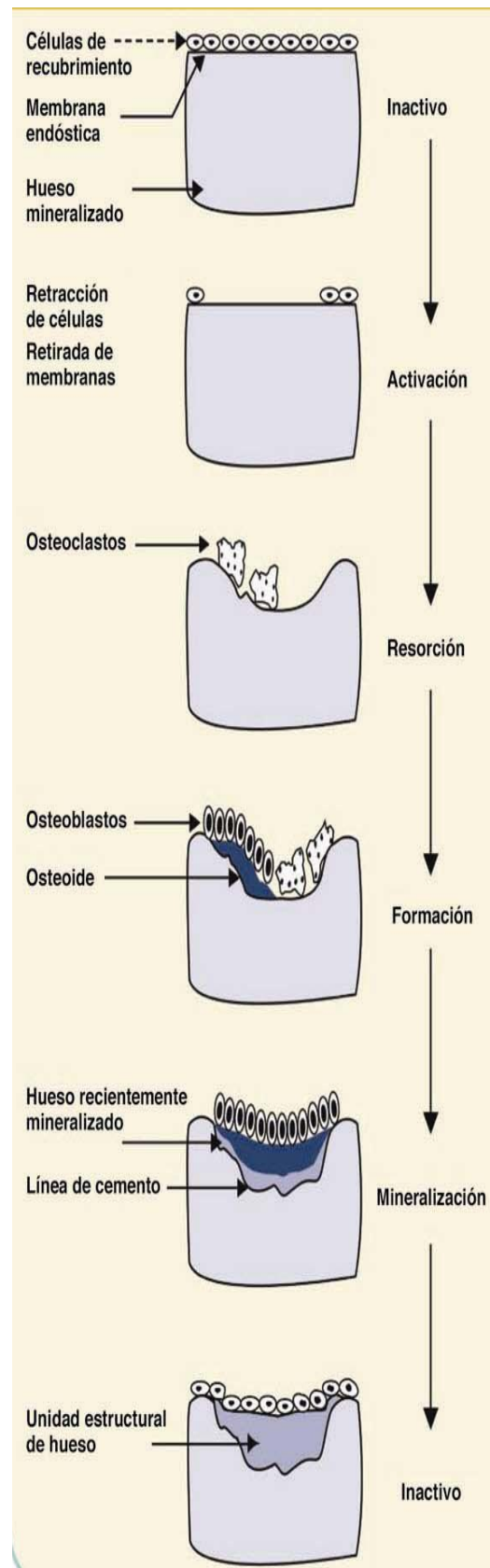


Figura 9: Representación esquemática de la remodelación del hueso trabecular. *Reproducido de Parthenon Publishing and Journal of Danish Medical Association.*

precursores proliferan, se diferencian y se fusionan, para formar las grandes células multinucleadas que constituyen los osteoclastos maduros. El fenómeno de activación es consecuencia de la intervención de una serie de señales, entre las que cabe destacar la situación endocrinológica general del individuo, cambios en el microambiente celular local, cambios en las fuerzas mecánicas locales y en la propia estructura ósea, surgidos como consecuencia del envejecimiento o de daños mecánicos. Para alcanzar la matriz ósea, los osteoclastos tienen que unirse a la superficie ósea; para ello, las células de revestimiento se retraen, dejando huecos a través de los cuales pasan los osteoclastos. Este proceso permite que la superficie quiescente se active.

Fase de resorción. Esta fase comienza cuando los osteoclastos completamente diferenciados empiezan a segregar al espacio existente entre el borde en cepillo y la matriz (laguna de Howship), protones y enzimas lisosomales proteolíticas (fundamentalmente catepsina K). La acidificación produce un fenómeno de desmineralización, y posteriormente, la matriz desmineralizada es degradada por las enzimas proteolíticas. Las sustancias liberadas del hueso pasan al interior del osteoclasto, que las procesa y finalmente acaban pasando al torrente circulatorio. Tras finalizar su actividad, los osteoclastos mueren por apoptosis.

Fase intermedia de reposo o inversión. Una vez finalizado el proceso de resorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto por unos pocos macrófagos que limpian la cavidad y tienen la función de formar la línea de cementación sobre la que se depositará hueso nuevo. En esta fase, probablemente, se establecen señales que reclutan a los preosteoblastos.

Fase de formación. Esta fase es llevada a cabo por los osteoblastos, una vez han madurado a partir de sus células precursoras, y se activan comenzando a depositar los componentes orgánicos de la matriz ósea, generando un tejido óseo no mineralizado llamado osteoide.

Fase de mineralización. Es la fase final del remodelado, y consiste en la mineralización del osteoide mediante el depósito de hidroxapatita de calcio.

1.4. Regulación del remodelado óseo: factores humorales

El remodelado óseo se encuentra regulado por múltiples factores, tanto a nivel local como sistémico, que van a controlar el reclutamiento, replicación, diferenciación y actividad de los osteoblastos y los osteoclastos [20] (Fig. 10) Además, la presencia de estímulos mecánicos es importante en el proceso de remodelado óseo.

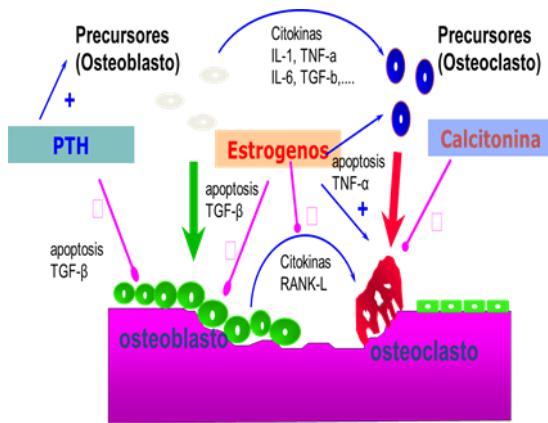


Figura 10: Remodelado óseo y hormonas

Existen diversas hormonas involucradas en el remodelado óseo. Algunas de ellas se encuentran a su vez reguladas por las concentraciones extracelulares de calcio, como son la PTH, la 1,25-dihidroxitamina D y la calcitonina, mientras que otras son independientes de ésta: andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento [20].



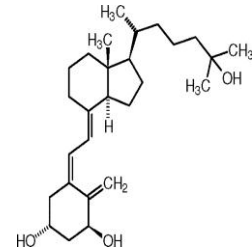
1.4.1. Hormona paratiroidea (PTH)

Como veremos más adelante, sus efectos sobre el tejido óseo son complejos. Niveles elevados y mantenidos de esta hormona producen un aumento de la actividad osteoclástica, mientras que su administración intermitente tiene efectos anabólicos [21]. Los efectos de la PTH son la transformación de osteocitos en osteo-

blastos activos y el aumento de la vida media de estos por disminución de la apoptosis, pero a la vez estimula la secreción de RANKL, IGF-1 e interleuquinas (IL-6 e IL-11) por los osteoblastos, lo que activa la diferenciación y función osteoclástica [22].

1.4.2. Calcitriol

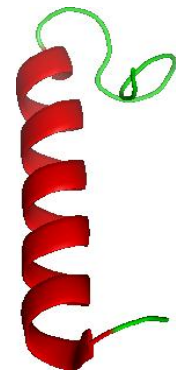
El calcitriol, también llamado 1,25-dihidroxitamina D,



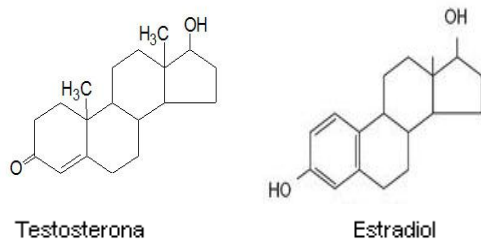
tiene múltiples acciones sobre el remodelado óseo, estimula la resorción ósea a través de su acción sobre osteoclastos y sus precusores. Entre otras acciones se incluye el aumento de la absorción intestinal de calcio y la inhibición de la secreción de PTH actuando sobre las paratiroides, e interviene también activando la mineralización ósea [23].

1.4.3. Calcitonina

In vitro inhibe la acción de los osteoclastos tras inducir un descenso en el número de receptores, aunque se desconoce la trascendencia biológica de esta acción [24]. Algunos autores proponen además acciones sobre los osteoblastos. El aumento observado de los niveles de calcitonina durante el crecimiento, el embarazo y la lactancia, apoyan su papel en los cambios que experimenta la masa ósea.



1.4.4. Hormonas sexuales



Las hormonas sexuales desempeñan un importante papel tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la masa ósea. Tradicionalmente se consideró que el papel de estrógenos y testosterona era específico del sexo, en la actualidad se sabe que ambos tipos de hormonas desempeñan acciones en el tejido óseo, al expresarse receptores para ambas hormonas independientemente del sexo. Las hormonas sexuales ejercen un efecto positivo sobre la masa ósea, inhibiendo la resorción y estimulando la formación. El efecto antirresorativo de los estrógenos es más potente, y aunque ambos estimulan la formación ósea, la testosterona influye fundamentalmente sobre osteoblastos maduros y osteocitos, mientras que los estrógenos regulan la actividad osteoblástica en distintas fases.

El papel de los estrógenos en el metabolismo óseo queda de manifiesto en la pérdida de masa ósea que ocurre en la menopausia, lo que ocasiona un aumento del remodelado debido a la elevación de distintas citoquinas proresorptivas, como IL-1, M-CSF y el factor de necrosis tumoral α

(TNF- α) [25]. Sus efectos sobre las células óseas están mediados por dos clases de receptores estrogénicos, el receptor α , presente en osteoblastos y osteoclastos, y el receptor β , expresado solo por osteoblastos. Los estrógenos ejercen además sus efectos positivos inhibiendo el desarrollo de los osteoclastos, favoreciendo su apoptosis por estímulo de la producción del factor de crecimiento tumoral β (TGF β) por los osteoblastos, y previenen además la apoptosis osteoblástica [26].

Aunque los andrógenos desempeñan funciones similares *in vitro*, en general los estudios que han investigado sus efectos sobre las células óseas no arrojan resultados tan concluyentes como los realizados con estrógenos, tanto para la producción de citoquinas como sobre la proliferación y diferenciación osteoblástica. Los principales efectos de los andrógenos tanto en varones como en mujeres son incrementar el tamaño óseo y estimular la formación, con un discreto efecto de inhibición de la resorción ósea. La mayoría de los estudios realizados *in vitro*, demuestran un efecto estimulador de la proliferación y diferenciación osteoblástica, a la vez que inhiben su apoptosis [27]. La existencia de un efecto directo de los andrógenos sobre los osteoclastos es controvertida, y se ha propuesto que gran parte de los efectos de inhibición osteoclástica están mediados de forma indirecta por la acción sobre osteo-

blastos, aunque es importante destacar que la mayoría de estos efectos no han sido comprobados *ex vivo*.

En varones, los andrógenos son responsables en gran medida del desarrollo de la masa muscular, lo que indirectamente también determina mayor tamaño óseo secundario a una mayor carga mecánica, aunque se desconocen los mecanismos por los que el aumento de masa muscular afecta el remodelado. Resultados obtenidos de estudios realizados en animales de experimentación, resaltan que el principal efecto esquelético de los andrógenos es la regulación del tamaño óseo por potenciación de la aposición de hueso sobre la superficie perióstica externa [28], presentando efectos anabólicos directos.

1.5. Sistema osteoprotegerina (OPG) /ligando de RANK (RANKL)

Entre los factores recientemente descubiertos que tienen un papel importante en la regulación del remodelado óseo, se encuentra el RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B), perteneciente a la superfamilia de ligandos del TNF. Es una proteína transmembrana expresada en osteoblastos, células del estroma y células del sistema inmune. Su producción varía dependiendo del grado de madurez y diferenciación de las células [29]. El mecanismo por el cual se activa el remodelado óseo es muy complejo, y para entenderlo hay que señalar que existe una estrecha interrelación entre

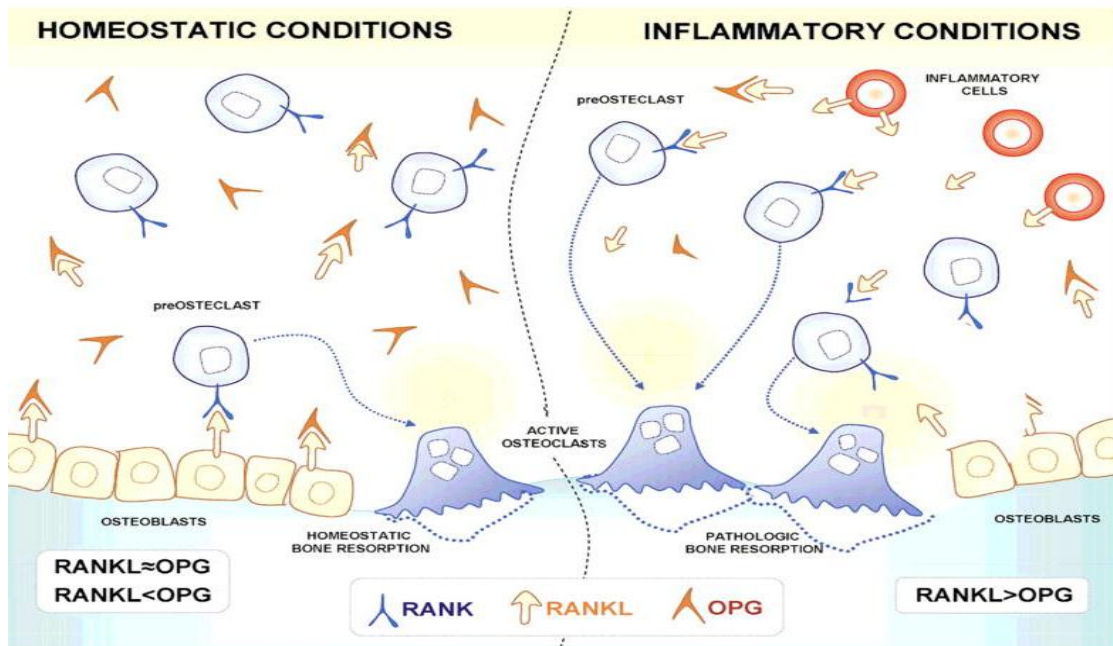


Figura 11: Papel de RANK, RANKL y OPG en la osteoclastogénesis en situación homeostática y patológica.

Reproducido en *J Endod.* 2008 August; 34(8): 932-938. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.002

la actividad y el desarrollo de osteoblastos y osteoclastos (Fig. 11). Como vimos anteriormente, los osteoclastos son células multinucleadas originadas a partir de precursores hematopoyéticos como resultado de su interacción con precursores de los osteoblastos que expresan RANKL.

La interacción de RANKL con su receptor (RANK) en los preosteoclastos inicia el proceso de osteoclastogénesis y, además, incrementa su capacidad resorptiva y prolonga su supervivencia. Además, el contacto célula-célula entre osteoblastos y osteoclastos a través del sistema RANK-RANKL hace que el osteoclasto cambie estructuralmente y se inicie la resorción ósea. La secreción de hidrogeniones y de enzimas líticas como TRAP en la laguna de resorción, completan el proceso. Es interesante reseñar que se requiere la presencia de M-CSF, producido también por los osteoblastos [30].

El sistema antes descrito se completa con la tercera sustancia reguladora del proceso: la osteoprotegerina (OPG), una proteína soluble expresada en una variedad de tejidos, incluidas las células osteoblásticas. La actividad biológica de OPG contrarresta los efectos de RANKL al actuar como un receptor “señuelo” de este último. De esta manera, al competir con la unión de RANK y RANKL, la OPG inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos y disminuye la resorción ósea. Por

lo tanto, las expresiones de RANKL y OPG en condiciones homeostáticas estarán coordinadas para regular la diferenciación y activación de los osteoclastos [30]. Son clásicos ya los estudios que ayudaron a comprender la función del sistema OPG-RANKL. Los ratones *knock-out* para OPG desarrollaban una osteoporosis grave, mientras que la sobreexpresión de OPG en ratones transgénicos producía osteopetrosis. Asimismo, la ausencia de RANKL en ratones producía osteopetrosis, ausencia de ganglios linfáticos y deficiencia de linfocitos B y T, mientras que la administración de RANKL en su forma soluble aumentaba la actividad osteoclástica.

Por otra parte, los factores hormonales actúan también modulando el acoplamiento osteoblastos-osteoclastos. Como hemos visto, los estrógenos constituyen el principal inhibidor endógeno de la resorción ósea, al reducir el número de osteoclastos (Fig. 12).

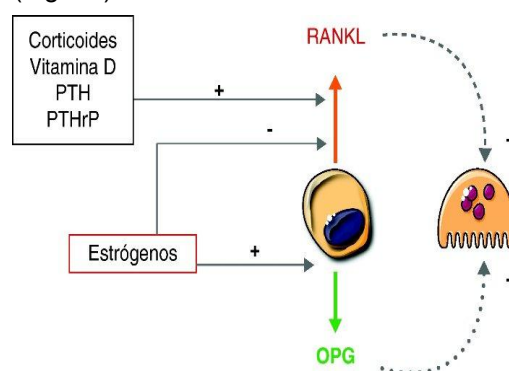


Figura 12: Hormonas y RANKL-OPG. Reproducido en Riancho J, *Reumatol Clín*, Vol 7, Suppl 2.

En los últimos años se ha descubierto un nuevo sistema regulador del remodelado óseo, llamado sistema Wnt/esclerostina [31], siendo la esclerostina un inhibidor de la formación ósea y el Wnt un activador.

Como hemos visto, el proceso de remodelado integra la unión de factores de diverso origen, lo cual le dota de una gran complejidad. El descubrimiento de las vías anteriormente nombradas ha complicado sustancialmente el conocimiento exacto del proceso de remodelado, pero a la vez abre la posibilidad de futuras terapias para el tratamiento de las enfermedades metabólicas óseas [32].

1.6. Marcadores del remodelado óseo

Como hemos visto anteriormente, el hueso está sometido a un proceso metabólico de formación y resorción, el remodelado óseo, que se inicia con la activación de la resorción ósea por el osteoclasto y le sigue la formación ósea llevada a cabo por el osteoblasto. En la vida adulta la cantidad de hueso formado es igual a la de hueso destruido (acoplamiento), pero existen situaciones en que una de estas actividades sobrepasa a la otra, produciendo en todo caso, desequilibrios en la resistencia ósea. Es por ello, por lo que resulta de extraordinario interés para el clínico poder cuantificar de algún modo las actividades formado-

ra y resorptiva del hueso, para identificar la situación del remodelado óseo en una circunstancia dada y poder instaurar o seguir un tratamiento. Hay que tener en cuenta, que el remodelado óseo puede también valorarse en la clínica de forma directa, mediante técnicas de histomorfometría a partir de la biopsia ósea.

La caracterización de los componentes celulares y extracelulares de la matriz esquelética ha permitido la identificación de marcadores bioquímicos que reflejan de forma específica los procesos de formación y resorción ósea. Los marcadores de remodelado incluyen enzimas y péptidos no enzimáticos, y se clasifican en función de la fase que representan, aunque algunos pueden ser reflejo de las dos fases debido al fenómeno de acoplamiento. Los marcadores que reflejan la actividad osteoblástica se denominan **marcadores de formación** y se determinan en suero. A los marcadores relacionados los osteoclastos se les denomina **marcadores de resorción**, y la mayoría se determinan en la orina (Tabla 1). La aplicación clínica actual más relevante de los marcadores de recambio óseo en la osteoporosis es la evaluación de la respuesta terapéutica, ya que no deben utilizarse en diagnóstico debido a su amplia variabilidad. También se ha estudiado su utilidad en la predicción del riesgo de fractura y de pérdida de masa ósea, así como su correlación con la DMO.

Tabla 1: Marcadores bioquímicos del remodelado óseo

Marcadores de formación
Enzimas sintetizadas por los osteoblastos
Fosfatasa alcalina total (FAT)
Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO)
Otras proteínas sintetizadas por osteoblastos
Osteocalcina (Bone Gla-Protein, BGP)
Propéptido carboxiterminal del procolágeno 1 (PICP)
Propéptido aminoterminal del procolágeno 1 (PINP)
Marcadores de resorción
Enzimas sintetizadas por los osteoclastos
Fosfatasa ácida resistente al tartrato (FART) en suero
Derivados de la degradación del mineral del hueso
Cociente calcio/creatinina
Derivados de la degradación del colágeno óseo
Hidroxiprolina.
Piridinolina (Pir) y deoxipiridinolina (Dpir) libres
Telopéptido carboxiterminal del colágeno I con puentes de piridinolina (ICTP) en suero
Telopéptido aminoterminal del colágeno I con puentes de piridinolina (NTX) suero y orina
Telopéptido carboxiterminal de la cadena $\alpha 1$ colágeno I (β -Cross-Laps, CTX) suero y orina

A continuación, comentaremos más en detalle algunos aspectos de los marcadores del remodelado óseo que se van a utilizar en el apartado de materiales y métodos de este trabajo.

1.6.1. Osteocalcina

La osteocalcina (Bone Gla-Protein, BGP) es una proteína de 49 aminoácidos sintetizada por los osteoblastos. Su principal característica estructural es la presencia del aminoácido gamma-carboxi-glutámico (Gla) en su secuencia, en posiciones 19, 21 y 24, formado tras la síntesis de la molécula por gamma-carboxilación del aminoácido glutámico. A través del Gla, la osteocalcina es capaz de unirse a la fase mineral del hueso (Fig. 13). Debido a que la porción que pasa al suero es directamente proporcional a la cantidad sintetizada por el osteoblasto, la osteocalcina se utiliza como marcador bioquímico de formación ósea [33].

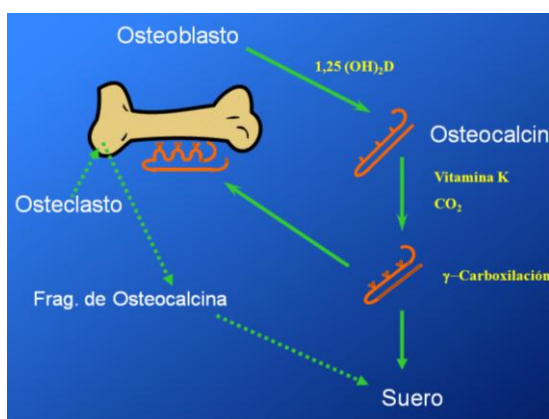


Figura 13: Síntesis de osteocalcina dependiente del osteoblasto.

1.6.2. PINP

El PINP o propéptido aminoterminal del colágeno I, es una proteína circulante en el suero, liberada durante el proceso de síntesis del colágeno I por el osteoblasto. La medida de esta proteína resulta ser un marcador de elevada sensibilidad en el estudio de la formación ósea en los procesos de osteoporosis [34].

1.6.3. Isoenzima 5b de la TRAP

La fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) es una enzima lisosomal liberada por el osteoclasto activo. El suero contiene otras isoenzimas de la fosfatasa ácida, pero sólo la que procede de los hematíes y la ósea son resistentes al tartrato. Por ello, la determinación de la actividad sérica de la fosfatasa ácida en presencia del anión tartrato constituye una medida específica de resorción ósea.

La TRAP se determina por una técnica sencilla, similar a la de la fosfatasa alcalina, pero realizada en medio ácido (pH=4,8), añadiendo tartrato sódico. Recientemente se ha demostrado que el suero contiene dos formas de TRAP, la 5a y la 5b. De ellas, la forma 5a contiene ácido siálico a diferencia de la forma 5b. Las propiedades antigénicas y el pH óptimo de la isoenzima 5b son idénticos a los de la TRAP purificada de los osteoclastos humanos, y completamente diferentes de las de

la isoenzima 5a, lo que sugiere que la forma 5b es la que procede de los osteoclastos, y la 5a de otras fuentes no determinadas [35]. Los ensayos colorimétricos y enzimáticos que se habían desarrollado hasta este momento, detectaban simultáneamente las formas 5a y 5b y esa podría ser una causa añadida de su falta de sensibilidad con respecto a otros marcadores de resorción ósea. En la actualidad existen métodos por los que es posible analizar específicamente la isoenzima 5b de la TRAP en suero, que es la que se determinará en este trabajo.

1.6.4. CTX

El telopéptido carboxiterminal (*CrossLaps*, CTX), es otro producto de degradación del colágeno tipo I, habiéndose desarrollado anticuerpos que ayudan a su identificación. Se trata de un fragmento de ocho aminoácidos perteneciente a la región telopeptídica C-terminal de la cadena α -1 del colágeno I. Este péptido se elimina generalmente unido a un puente de piridinolina.

Se ha descubierto que el fragmento CTX es susceptible de isomerización. Dentro de su secuencia de 8 aminoácidos (EKAHDGGR), la unión D-G es un lugar potencial de β -isomerización [36]. De hecho, el CTX que proviene de colágeno recién sintetizado tiene una estructura lineal (α -CTX), pero el grado de isomerización (β -

CTX) aumenta al aumentar la edad del colágeno óseo.

En los adultos, la mayor proporción de C-telopéptido se encuentra en la forma beta. Por ello, cuando nos referimos al CTX hablamos implícitamente del β -CTX.

1.7. Masa ósea y calidad ósea

La existencia de una masa ósea baja ha sido la idea más constantemente vinculada al concepto de osteoporosis. La propia etimología de la palabra osteoporosis: “huesos porosos”, se relaciona tanto con la idea de una pérdida de masa ósea como con un trastorno de la microarquitectura, ya que los “poros” se refieren a los huecos que aparecían en el entramado trabecular (y, por lo tanto, a la falta de trabéculas). Hay trastorno de la microarquitectura porque se ha perdido hueso, y la pérdida de hueso se establece a expensas del adelgazamiento o la desaparición de los elementos estructurales del mismo (trabéculas, cortical ósea) [37]. (Fig. 14)

Por otra parte, una masa ósea inadecuadamente baja, además de ser un factor de riesgo de fractura, es un elemento definitorio de la enfermedad. No es extraño, por tanto, que se la haya elegido como criterio diagnóstico. En estos momentos, y a propuesta de la OMS, la osteoporosis se diagnostica en función de la existencia de una densidad mineral ósea (DMO) baja.

En definitiva, masa ósea baja y alteración de la microarquitectura son dos caras de una misma moneda. Lo más interesante de esta asociación es que justifica que el aumento de la fragilidad que acompaña a la pérdida de masa ósea sea desproporcionado para la misma. El proceso que subyace a ambos fenómenos es una alteración del remodelado, por lo que la osteoporosis podría identificarse también como una enfermedad propia del remodelado óseo [37].



Figura 14: Resorción osteoclástica profunda en una trabécula horizontal de la 3ª vértebra lumbar en una mujer de 84 años. Reproducido de L. Mosekilde. Elsevier Science®

Calidad ósea es un concepto impreciso, en el que se ha pretendido incluir todo aquello que, siendo ajeno a la masa ósea, condiciona la fragilidad del hueso. En un sentido más apropiado, debería guardar relación fundamentalmente con las características del tejido óseo: las propiedades del colágeno, la situación de la mineralización del osteoide, el acumulo de líneas de ce-

mentación (resultado del recambio óseo), la presencia de lesiones de fatiga, etc. Algunas veces se incluye en el concepto de calidad la microarquitectura, pero ya hemos visto su interdependencia con la masa ósea [37]. También podría considerarse el recambio óseo, que guarda una relación con la fragilidad del hueso menos vinculada a la masa ósea. La calidad ósea, de la cual depende la resistencia ósea y el riesgo de fractura, es por tanto el resultado integrado de diversas características óseas, como son la cantidad ósea y las características estructurales y dinámicas del hueso (Fig.15).

1.8. Medidas de la cantidad: Densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea (DMO) es la cantidad de mineral en gramos por unidad de área o de volumen óseo ($\text{gr } \text{cm}^2$ ó cm^3). Como indica su denominación, la principal aplicación de este método es la medición cuantitativa de la densidad de los depósitos minerales de los huesos, que condicionan sus propiedades mecánicas. La masa ósea y la DMO se utilizan como sinónimos y presentan una relación directa con la resistencia ósea, considerándose que la DMO justifica hasta un 85% de la resistencia efectiva.

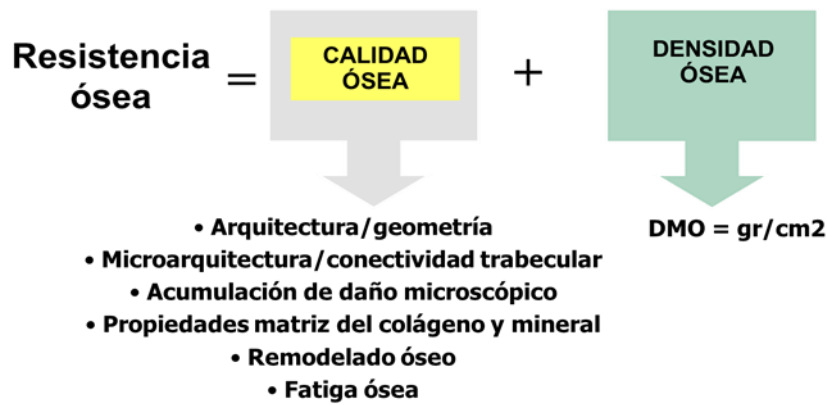


Figura 15: Factores que influyen en la resistencia a la fractura. Modificado de Chesnut y Rosen, *J Bone Min Res* 2001

Se ha comprobado que el riesgo de fractura es inversamente proporcional a la DMO, siendo que algunos estudios sugieren que el riesgo de fractura de una zona de hueso depende de la DMO en dicha localización [38]. Sin embargo, es la combinación de la DMO y los factores de riesgo clínicos lo que consigue una mejor estimación del riesgo de fractura, ya que estos últimos nos informan sobre la calidad ósea de dicho individuo. Los factores de riesgo clínicos más importantes son la edad y la presencia de fractura osteoporótica previa.

Un estudio clásico publicado en NEJM, (Fig. 16) identificó que la disminución de la DMO (abscisas en el gráfico) era un factor importante de riesgo, ya que incrementaba el riesgo de fractura de cadera en un cohorte de mujeres mayores de 65 años [39].

1.9. Métodos para determinar DMO

1.9.1. Absorciometría de rayos X de doble energía

Son muchos los métodos de imagen (Tabla 2) que se han utilizado para medir la DMO, con objeto de identificar masa ósea baja e individuos con un elevado riesgo de fracturas. De ellos, el más utilizado y considerado método estándar en la actualidad, es la absorciometría de rayos X de doble energía (DXA). En este caso se utilizan dos tipos de fotones obtenidos de un tubo de rayos X, logrando una mayor exactitud y precisión al utilizar dos medidas simultáneas a través del cuerpo. La medida de DMO puede hacerse en todo el cuerpo (masa ósea total) o bien seleccionar una

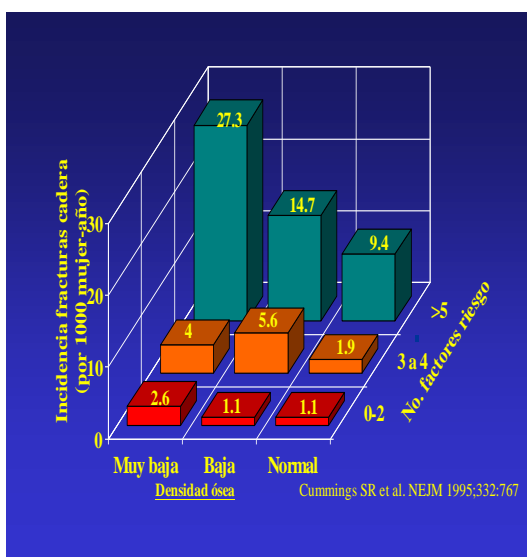


Figura 16: Riesgo anual de fractura de cadera en relación con la tasa de fractura por 1000 mujeres-años

“región de interés” corporal para realizar la determinación. Los sectores del esqueleto que habitualmente se consideran más apropiados para el diagnóstico de osteoporosis son la columna lumbar y el tercio proximal del fémur.

Tabla 2: Métodos de medición in vivo del contenido mineral óseo

Métodos de medición in vivo del contenido mineral óseo		
Contenido mineral del cuerpo entero		
Absorciometría de doble energía (DXA total)		
Contenido mineral de regiones específicas		
Absorciometría de doble energía (DXA local)		
Ultrasonidos (QUS)		
Tomografía	computarizada	cuantitativa (QCT)

En cuanto a la interpretación de los resultados, la capacidad predictiva de la medida de la DMO en relación con el desarrollo de la fractura es comparable en magnitud a la que tiene la presión sanguínea en relación con el accidente vascular cerebral, y mejor que la del colesterol sérico para la enfermedad coronaria [37]. El riesgo relativo de fractura aumenta de 1,5 a 2,5 veces

por cada disminución de una desviación estándar en la DMO con respecto a controles de la misma edad. Existe una relación exponencial entre la pérdida de DMO y el incremento en el riesgo de fractura.

Además, debido a la baja dosis de radiación recibida, su disponibilidad y fácil uso, hacen que la DXA sea una técnica ampliamente utilizada tanto en ensayos clínicos, estudios epidemiológicos, como en la clínica en general para la determinación de la DMO. **En el presente trabajo utilizaremos esta técnica para la determinación de la DMO en nuestros animales de experimentación.**

1.9.2. Otros métodos

1.9.2.1. Tomografía computarizada cuantitativa

Presenta la ventaja, al igual que la proyección lateral de DXA, de poder aislar el hueso trabecular del cuerpo vertebral, y medir la DMO sin la influencia de la apófisis espinosa. Por ello parece ser ligeramente mejor predictor del riesgo de fractura vertebral que la proyección antero-posterior de DXA [40]. Sin embargo la tomografía computarizada cuantitativa es poco utilizada al ser más cara, menos reproducible y requerir una mayor irradiación que la medición de DMO mediante DXA.

1.9.2.2. Ultrasonografía

Mide la transmisión del ultrasonido a través de los huesos accesibles a este. La velocidad de transmisión de la onda está en relación con la densidad ósea, por lo que es posible correlacionar la medida ultrasonográfica con la DMO. Las principales ventajas frente a la técnica DXA son el menor coste, la portabilidad de los aparatos y la nula exposición a radiación para el paciente. La medida de DMO suele realizarse sobre hueso calcáneo, y parece ser un buen predictor del riesgo de fractura de cadera [41]. Algunos estudios incluso sugieren que la medida cuantitativa ultrasonográfica es, al menos, tan buena como otros factores clínicos de riesgo de fractura en mujeres en riesgo de osteoporosis [42].

A pesar de la existencia de otros métodos diagnósticos con ventajas e inconvenientes, la mayoría de los pacientes de alto riesgo precisarán la realización de DXA confirmatoria, tanto para determinar la necesidad de tratamiento como para monitorizar los resultados de este.

1.10. Medidas de la calidad:

Características estructurales óseas

Las características estructurales del hueso son aquellas que contribuyen, junto con la masa ósea, a la integridad ge-

neral del hueso y su resistencia a la fractura [43].

Dichas características se pueden dividir en dos grupos fundamentales:

-Arquitectura ósea: Que engloba tanto la macroarquitectura (tamaño, forma y geometría y densidad trabecular del hueso estudiado) como la microarquitectura, es decir, la manera cómo se interconecta el tejido óseo en dicho hueso (grosor trabecular, conectividad, porosidad, número de trabéculas...)

-Propiedades materiales y dinámicas del hueso: Como son el grado de mineralización ósea, el tamaño y la orientación de los cristales de hidroxipatita, el daño acumulado, las microfracturas y la reparación de estas, la composición ósea (porcentaje de hueso trabecular y cortical), las características de la matriz ósea, las estructura del colágeno, las conexiones entre los diferentes componentes óseos, etc...

A pesar de que el efecto individual de algunos de estos componentes sobre la resistencia ósea no está claro, se acepta que la resistencia mecánica del hueso es el reflejo de la suma de la masa y las características estructurales y dinámicas óseas.

Por lo que hemos visto anteriormente, hemos de recordar que el tejido óseo no es homogéneo. Existen dos tipos de tejido claramente diferenciados (trabe-

cular y cortical), y la macro y microarquitectura de cada hueso de organiza de acuerdo con los sitios de mayor carga o estrés (Fig. 17)

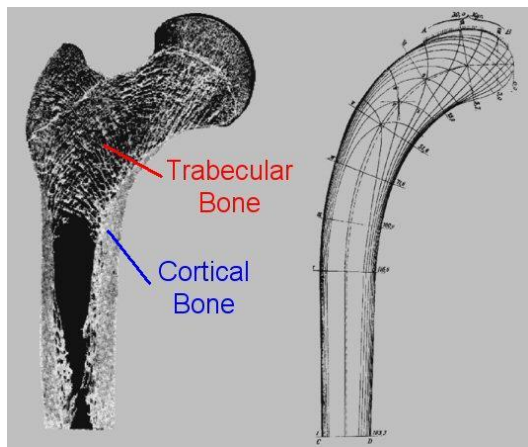


Figura 17: Sección longitudinal del fémur humano. Imagen derecha: líneas de carga principales.
http://www.feppd.org/ICBDent/campus/biomechanics_in_dentistry

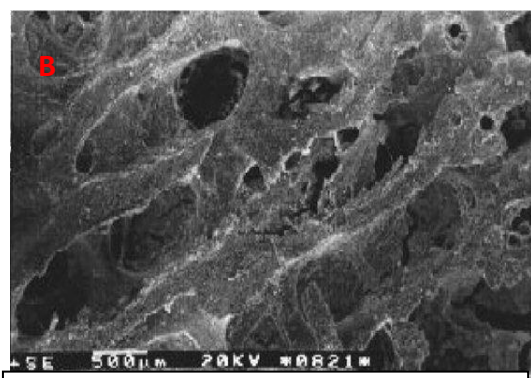
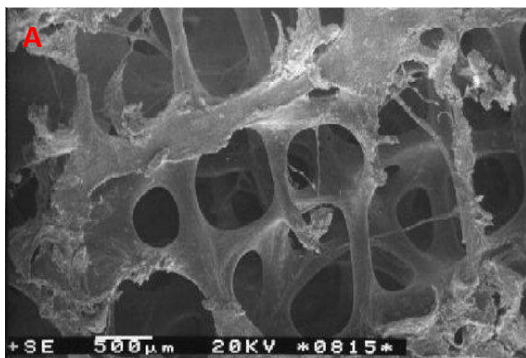


Fig.18: Microtomografía computarizada

A: Estructura trabecular vértebra L1

B: Estructura trabecular calcáneo

http://www.feppd.org/ICB-Dent/campus/biomechanics_in_dentistry

puesto por estructuras cilíndricas (osteonas), la estructura del hueso trabecular es muy variable. La figura 18 muestra la diferencia entre las estructuras trabeculares de la vértebra L1 y del calcáneo en un varón de 24 años, en la que se puede observar que el hueso trabecular remodela su estructura en función de las necesidades de carga y estrés que deban soportar los huesos, para determinar su competencia.

De esta manera, en función de su composición (% de hueso cortical y trabecular) y de la disposición del hueso trabecular, las diferentes estructuras óseas resultan en diferentes propiedades mecánicas, con un grado amplio de variabilidad en función del sexo, edad, localización anatómica, raza, actividad física, etc. En la tabla 3 que aparece a continuación, se puede ver cómo evolucionan las características biomecánicas de la cortical del fémur de un sujeto sano en relación con la edad.

Property	Age (years)						
	10 - 20	20 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	60 - 70	70 - 80
Ultimate strength (MPa)							
Tension	114	123	120	112	93	86	86
Compression	-	167	167	161	155	145	-
Bending	151	173	173	162	154	139	139
Torsion	-	57	57	52	52	49	49
Ultimate strain (%)							
Tension	1.5	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3
Compression	-	1.9	1.8	1.8	1.8	1.8	-
Torsion	-	2.8	2.8	2.5	2.5	2.7	2.7

Tabla 3: Biomecánica cortical en el fémur

www.feppd.org/ICB-Dent/campus/biomechanics_in_dentistry

Para poder estudiar la resistencia del hueso, se emplea una disciplina de la ingeniería mecánica y la ingeniería estructural denominada **resistencia de materiales**. La resistencia de un elemento, en nuestro caso un tejido corporal, se define como su capacidad para resistir esfuerzos y fuerzas aplicadas sin romperse, adquirir deformaciones permanentes o deteriorarse de algún modo. Para cada sólido deformable, el cálculo de su resistencia se realiza mediante modelos matemáticos, que establecen relaciones entre las fuerzas aplicadas, también llamadas cargas, y los esfuerzos y desplazamientos inducidos por ellas. Generalmente las simplificaciones geométricas y las restricciones impuestas sobre el modo de aplicación de las cargas hacen que el campo de deformaciones y tensiones sean sencillos de calcular.

El hueso trabecular es un material anisótropo, lo que significa que sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con la dirección de la carga aplicada (figura 19). El hueso cortical frecuentemente se considera un material ortotrópico, que es un tipo de material anisótropo cuyo comportamiento ante la carga puede caracterizar matemáticamente mediante tres módulos de Young (E_1 , E_2 , E_3), tres módulos shear (G_{12} , G_{13} , G_{23}) y seis coeficientes de Poisson (ν_{12} , ν_{13} , ν_{23} , ν_{21} , ν_{31} , ν_{32}).

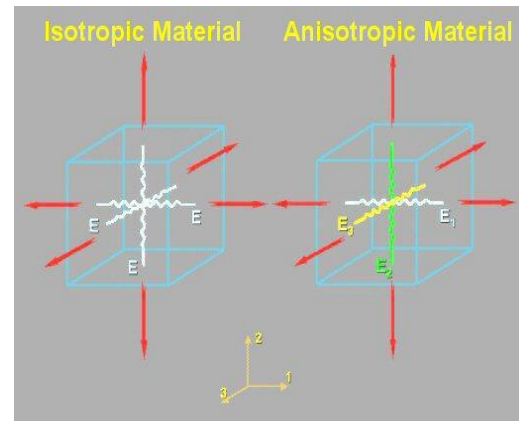


Figura 19: Comportamiento mecánico de materiales isotrópicos y anisotrópicos.

http://www.feppd.org/ICBDent/campus/biomechanics_in_dentistry

La caracterización mecánica del hueso trabecular es más difícil aún. Las propiedades mecánicas de este tipo de tejido como un todo se relacionan con las características mecánicas de cada simple trabécula. La figura 20 muestra la interdependencia del módulo de Young del hueso trabecular con la densidad mineral ósea.

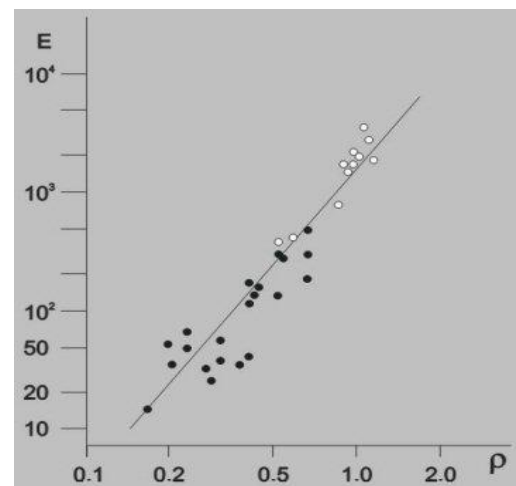


Figura 20: Módulo de Young del hueso trabecular expresado como una función de la DMO.

Densidad (ρ) en g/cm^3 y Módulo de Young (E) en MPa. http://www.feppd.org/ICB-Dent/campus/biomechanics_in_dentistry

1.11. Evaluación de la estructura ósea

La investigación de los parámetros estructurales óseos está proporcionando un mejor conocimiento en la patogénesis de la osteoporosis y del mecanismo de acción de los tratamientos para esta patología. Sin embargo aún no es factible su medida de forma rutinaria en la práctica clínica, ya que con la excepción de los marcadores de remodelado óseo, no están aún disponibles técnicas no invasivas validadas para la evaluación clínica de estos aspectos de la calidad ósea. A continuación repasamos las técnicas más importantes.

1.11.1. Histomorfometría

Consiste en el análisis cuantitativo de muestras de hueso obtenidas por biopsia ósea transilíaca, y permite la evaluación de las alteraciones del recambio óseo de los diversos componentes que integran el tejido óseo.

La biopsia ósea debe incluir hueso cortical y trabecular, y debe ser representativa del tejido óseo del sujeto para obtener información cualitativa y cuantitativa (Fig. 21). La muestra se incluye sin descalcificar en un material plástico (metilmetacrilato), que al polimerizarse adquiere un grado de dureza semejante al del tejido óseo, y confiere al bloque resultante una consistencia homogénea.

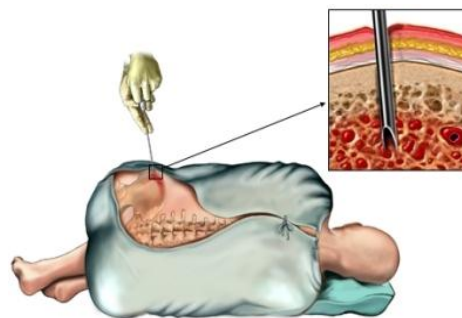


Figura 21: Técnica de biopsia transilíaca

La histomorfometría ósea permite calcular una amplia serie de parámetros estáticos y dinámicos. Los primeros se obtienen midiendo las diferentes estructuras en los cortes teñidos. Así es posible determinar parámetros de la estructura ósea como volumen trabecular, número de trabéculas, separación entre las mismas, etc.

1.11.2. Microtomografía ósea

La microtomografía computarizada (μ TC) es una técnica radiológica que proporciona imágenes tridimensionales de la estructura interna de órganos y tejidos a una alta resolución de forma no destructiva, permitiendo gracias a potentes programas informáticos la evaluación cuantitativa de dichas estructuras (Fig. 22) [44].

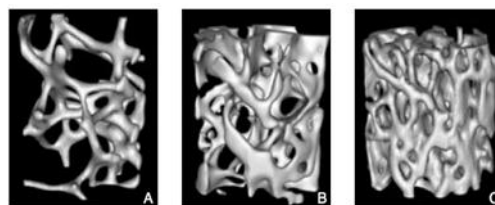


Figura 22: Microestructura trabecular de biopsias transilíacas mediante μ TC

Reproducido Rev Osteoporos Metab Miner 2011 3; 1:9-16

El microtomógrafo computarizado, es un aparato que proporciona una imagen similar a la de tomografía computarizada (TC) tradicional, aunque con la diferencia de que permite adquirir imágenes tridimensionales óseas con una gran resolución: desde 5 a 100 μm^3 , mientras que la de los TC habituales varía entre 1 y 2,5 mm^3 . Esta resolución corresponde a un voxel (unidad mínima de imagen volumétrica que es capaz de discriminar el aparato) de tan sólo $1 \cdot 10^{-7} \text{ mm}^3$, frente al habitual de 10 mm^3 de los TC habituales. Gracias a esto logra individualizar y estudiar cada trabécula por separado, siendo de gran utilidad para el estudio óseo en general y del hueso trabecular en particular.

Además, con el desarrollo de los diferentes sistemas de procesamiento y análisis de imágenes mediante ordenadores que calculan complejos algoritmos, es factible el estudio de la microarquitectura trabecular ósea no sólo en dos dimensiones, como hace la histomorfometría, sino también lograr una imagen tridimensional de toda la red trabecular para su posterior estudio informático. Esta posibilidad del estudio tridimensional del hueso trabecular supone una ventaja añadida del μTC , ya que permite el cálculo directo de numerosos parámetros microarquitecturales que de otra forma tendrían que ser calculados en forma de aproximaciones, asumiendo modelos es-

tructurales que no tienen por qué corresponder fielmente con la realidad.

A diferencia de la DMO calculada por DXA, el μTC calcula la DMO en un volumen de hueso (DMO volumétrica), y es usado a menudo como referencia para validar la DMO medida por tomografía computarizada cuantitativa y resonancia magnética. La principal limitación consiste en que para lograr una alta resolución precisa también unas dosis de radiación elevadas, por lo que su uso actualmente está restringido al estudio óseo *ex-vivo*.

En el presente trabajo se ha utilizado la microtomografía como técnica para determinar las propiedades estructurales del fémur proximal de los animales.

1.11.2.1. Parámetros de medida

La lista de parámetros microestructurales cuantitativos susceptibles de medirse mediante el μTC es muy amplia. Los más importantes que corresponden a la estructura trabecular son:

- Fracción volumétrica ósea (BV/TV)
- Grosor trabecular (Tb.Th)
- Separación trabecular (Tb.Sp)
- Número de trabéculas (Tb.N)
- Factor de patrón trabecular (Tb.Pf)
- Grado de anisotropía (DA)
- Índice estructural del modelo (SMI)

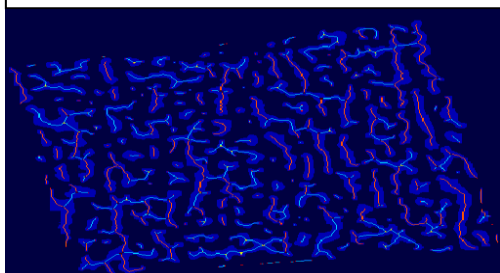
Los principales parámetros correspondientes a la estructura cortical, son:

- Área cortical transversal media (B.Ar)
- Momento polar de inercia medio (MMI)

Los parámetros histomorfométricos se suelen nombrar por sus siglas en inglés, las cuales podemos ver más arriba. Dichas siglas están estandarizadas desde 1987, con la publicación de Parfitt et al.[45], exceptuando algún parámetro de uso más reciente. Es necesario destacar que todos los parámetros microestructurales se calculan sobre una región anatómica seleccionada previamente, determinada región de interés (ROI, *region of interest*).

Explicamos a continuación la metodología para la realización de la técnica: Tras escanear y durante el procesamiento de la imagen, el programa informático analiza cada imagen microtomográfica individualizándola en una unidad mínima (voxel). Posteriormente el contenido de cada voxel será clasificado, en función de la imagen a la que corresponda, como “tejido óseo” o “sin tejido óseo”. A este proceso se le denomina binarización de la imagen, (Fig. 23) y permite al programa informático hacer todos los análisis a los que nos vamos a referir con posterioridad.

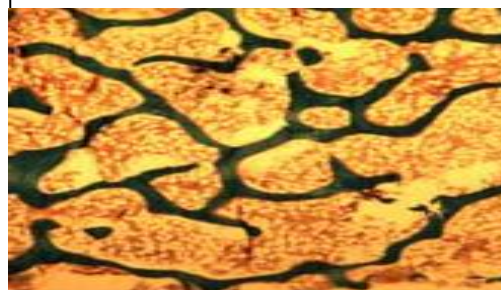
Figura 23: Binarización de imagen, partiendo de radiografía de vértebra lumbar.



FRACCIÓN VOLUMÉTRICA OSEA

La fracción volumétrica ósea (BV/TV) corresponde al porcentaje de voxels binarizados como contenido óseo, sobre el total de voxels analizados en la región de interés. A este parámetro también se le conoce por sus siglas en inglés: BV/TV (*Bone volume /Tissue Volume*).

Figura 24: Biopsia de hueso trabecular. BV/TV=22%. *Osteoporosis Bone Physiology*
<http://courses.washington.edu/bonephys/ophome.html>



GROSOR TRABECULAR

Este parámetro se identifica por las siglas Tb.Th (*Trabecular Thickness*) y requiere un análisis tridimensional donde cada trabécula puede ser medida mediante un programa informático.

Los cálculos se realizan asumiendo que un punto cualquiera de la trabécula puede ser englobado por diferentes esferas de tejido óseo, por tanto el grosor trabecular en dicho punto corresponderá al diámetro de la esfera mayor que englobando dicho punto se encuentre en todo momento contenida dentro de los voxels de tejido óseo. De esta forma para calcular el valor del grosor trabecular, el programa informá-

tico calcula la media de los grosores trabeculares para cada punto de la trabécula.

SEPARACIÓN TRABECULAR

La separación trabecular (Tb.Sp, *Trabecular Spacing*) se calcula igual que el grosor trabecular, pero utilizando para el cálculo los voxels binarizados como “sin tejido óseo”. Es decir es el grosor de los espacios sin tejido óseo que existen entre cada trabécula.

NÚMERO DE TRABÉCULAS

El número de trabéculas (Tb.N, *Trabecular Number*) por unidad de volumen se calcula por medio de programas informáticos utilizando la fórmula *Parallel plate model*.

$$Tb.N = (BV/TV) / Tb.Th$$

Tb.N: Número de trabéculas
BV: Volumen del tejido óseo
TV: Volumen total de la región de interés
Tb.Th: Grosor Trabecular

FACTOR DEL PATRÓN TRABECULAR

El factor de patrón trabecular (Tb.Pf, *Trabecular Pattern Factor*) se calcula mediante un artificio matemático, en el cual se comparan el volumen y la superficie trabecular antes y después de pedirle al programa informático que engrose levemente las trabéculas del volumen de interés.

En espacios intertrabeculares abiertos, debido a un escaso número de uniones trabeculares, si engrosamos las trabéculas aumentará también la superficie de estas. Sin embargo en espacios intertrabeculares cerrados, debido a la existencia de un alto número de conexiones, al aumentar el volumen trabecular, disminuirá por el contrario su superficie (Fig. 25).

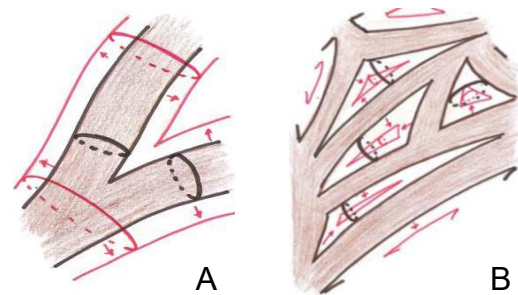


Figura 25: Trabecular Pattern Factor: El contorno trabecular inicial se ve en negro y en rojo el contorno después del artificio matemático de la expansión del volumen. En espacios trabeculares abiertos (A), al expandir las trabéculas aumenta el perímetro y la superficie trabecular. En espacios trabeculares cerrados (B), al aumentar el volumen trabecular disminuye el espacio intertrabecular y la superficie trabecular

El cálculo se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$Tb.Pf = (P1 - P2) / (A1 - A2)$$

Tb.Pf: Trabecular Pattern Factor
P1: Volumen/Área trabecular inicial
P2: Volumen/Área trabecular tras dilatación
A1: Superficie/Perímetro trabecular inicial
A2: Superficie/Perímetro trabecular tras dilatación

El Tb.Pf es, por lo tanto, un índice de conectividad inverso, con lo cual a mayor Tb.Pf, menor número de conexiones trabeculares.

GRADO DE ANISOTROPÍA

Se define isotropía, (etimológicamente del griego *ἴσος* [isos], equitativo o igual, y *τρόπος* [tropos] lugar, dirección), como la característica de los cuerpos cuyas propiedades físicas no dependen de la dirección. Es decir, se refiere al hecho de que ciertas magnitudes dan resultados idénticos con independencia de la dirección escogida para dicha medida. El grado de anisotropía (DA, *degree of anisotropy*) es una medida que indica que determinadas propiedades (en el caso que nos ocupa, la resistencia del hueso a la fractura) pueden variar en función de la dirección en que son examinadas. Por lo tanto, cuanto menor sea el grado de anisotropía, menos ordenadas se encontrarán las trabéculas y más resistente será el hueso.

Observando la figura 26, se puede intuir que en el caso de que apliquemos una carga en una determinada dirección a ambas estructuras, en el caso de la figura B (estructura con mayor DA) sería más fácil encontrar un camino para que esa fuerza se propague, y la estructura por lo tanto es más fácil de romper. Sin embargo, si la estructura es isotrópica (menor DA) el camino de propagación de dicha fuerza es más difícil de encontrar y por lo tanto la estructura es más resistente. Los huesos vivos no se pueden considerar como cualquier otro material utilizado en ingeniería, por complejo que éste pueda ser. La diferencia fun-

damental estriba en el hecho de que la estructura microscópica de éstos permanece constante, mientras que la estructura ósea se encuentra en un continuo proceso de crecimiento o resorción, que constituye el mecanismo mediante el cual el hueso adapta su estructura para soportar mejor los esfuerzos a que está sometido [46].



Figura A

Figura B

Figura 26: Esquema comparativo de anisotropía.

A: Estructura isotrópica, componentes desordenados en las tres direcciones espaciales.

B: Estructura anisotrópica, componentes ordenados, más susceptible de fractura.

El valor del DA se obtiene calculando la longitud media que tendría un plano que corte las trabéculas en la región de interés. Si la longitud media de corte fuese muy diferente al variar la posición de dicho plano, entonces nos encontraríamos ante una estructura ordenada o anisotrópica. Si por el contrario al variar la posición del plano de corte, la longitud media de corte fuese homogénea, nos encontraríamos ante una estructura desordenada o isotrópica.

Hay dos maneras de calcular el DA con el μ TC: en un caso los valores van desde 1 (isotropía total) hasta el infinito, estando normalmente los valores para hueso trabecular entre 1 y 3. En el otro modo de cálculo los valores van desde 0 (isotropía total) hasta 1 (anisotropía total). Este método, por tanto, emplea una escala matemática más reducida. **En nuestro trabajo, obtendremos resultados cuyo rango está entre 1 y el infinito:**

El grado de anisotropía, junto con el porcentaje de volumen óseo y el resto de parámetros nombrados, se consideran los mayores determinantes de la resistencia ósea [47].

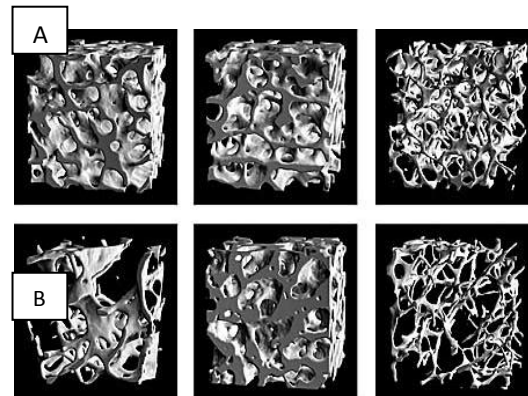
ÍNDICE ESTRUCTURAL DEL MODELO

Durante el desarrollo de la OP se genera una pérdida de masa ósea que afecta con mayor intensidad a los huesos con un mayor componente trabecular: las trabéculas van adelgazando y modificando su estructura. Esta conformación tridimensional de las trabéculas es lo que trata de medir el índice estructural del modelo (SMI, *Structural Model Index*).

Atendiendo a la morfología de las trabéculas, podemos dividir las en dos tipos. Denominamos trabéculas en forma de barra o tubo (*rod-like trabeculae*) a las estructuras trabeculares en las cuales un eje del espacio predomina sobre los otros dos, y trabéculas en forma de plato o placa (*plate-*

like trabeculae) a las estructuras trabeculares en las cuales hay dos ejes del espacio predominantes.

En la figura 27 podemos ver en las imágenes superiores una estructura donde predominan las trabéculas tipo plato o placa, y en las imágenes inferiores una estructura con predominancia de trabéculas tipo barra o tubo.



El SMI indica la prevalencia relativa

Figura 27: Arquitectura trabecular en biopsias óseas de vértebra lumbar, cresta iliaca y cabeza femoral. Las imágenes superiores (A) son de un varón de 37 a., y las inferiores (B) de un varón osteoporótico de 84 a. Müller, Ralph. <http://www.orthojournalhms.org/volume2/html>

de trabéculas en forma de placa o en forma de tubo. Se define en un intervalo de valores de 0 a 3, donde 0 es una estructura en forma de placa ideal, y 3 un tubo ideal. Cuanto mayor sea el SMI, mayor será la proporción de estructuras tubo y menos resistente será la estructura trabecular. De la misma manera que para calcular el Trabecular Pattern Factor, el cálculo del SMI está basado en la dilatación del modelo de voxels tridimensionales [48], siendo su fórmula:

$$SMI = 6. S2. V / (S1)^2$$

V = Volumen inicial trabecular.

S1 = Superficie trabecular inicial.

S2 = Superficie trabecular tras dilatación

ÁREA CORTICAL TRANSVERSAL MEDIA

Corresponde a la medida del área total transversal de hueso cortical, es decir. Al hueso existente dentro de la envoltura perióstica. Su unidad son los mm²

MOMENTO POLAR DE INERCIA MEDIO

Es un índice básico de resistencia mecánica, que indica la oposición a la rotación de una sección transversal de tejido a lo largo de un eje determinado, asumiendo la existencia de propiedades biomecánicas uniformes del material. Se obtiene calculando la media de los momentos de inercia máximo y mínimo, y se mide en mm⁴.

Otras medidas microestructurales corticales interesantes son el espesor cortical medio (medido en mm) y la porosidad, que corresponde al cociente entre el volumen de poros (Po.V, mm³) y el volumen total de hueso del compartimento cortical. (Ct.V, mm³) y se mide como un porcentaje.

1.12. Biomecánica ósea

Un test mecánico para medir resistencia ósea debe tener en cuenta los siguientes requerimientos:

- Debe producir fracturas similares a las que se observan en la práctica clínica
- Debe reflejar las características de la geometría ósea, y en la menor proporción posible, la longitud o tamaño relativo del hueso estudiado.
- La carga aplicada debe estar homogéneamente distribuida a través del material, de manera que se puedan identificar los puntos más débiles en el hueso.
- La carga se debe aplicar de una manera controlada y reproducible.
- El aparato de medida debe ser relativamente simple y fácil de ajustar.

Las propiedades biomecánicas del hueso están directamente relacionadas con su calidad. Su medida nos permitirá conocer el grado de resistencia a la fractura, que es el evento clínico final y fundamental a evitar en las patologías que afectan a la calidad ósea [49].

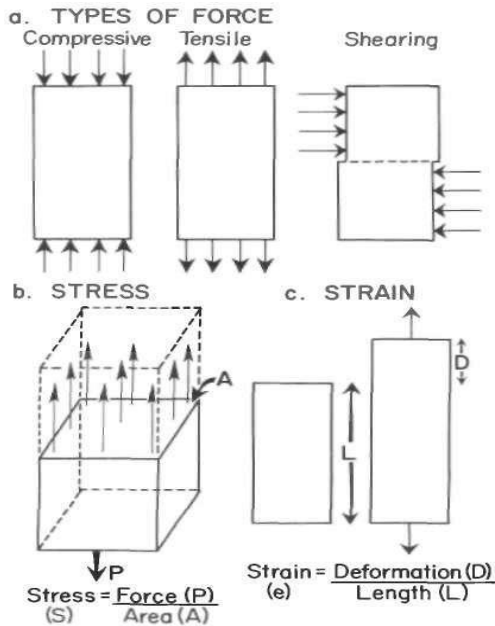


Figura 28: Tipos de fuerzas

La medición biomecánica de los tejidos óseos se realiza mediante instrumentos (máquina de ensayos) que presionan y deforman el tejido. Según el ángulo y la forma de aplicación de la fuerza, ésta puede clasificarse en: compresión (*compressive*) cuando el cambio en la forma del objeto se manifiesta en forma de acortamiento, tracción (*tensile*) si se manifiesta en forma de alargamiento y corte (*shearing*), si produce cizallamiento del objeto (figura 28). Aunque estos son los tres tipos de fuerzas puras, en biomecánica suelen aparecer muy a menudo las fuerzas de flexión (*bending*), que producen la curvatura del objeto y de torsión (*twisting*), que causan un retorcimiento del objeto. Los esfuerzos de flexión son realmente esfuerzos de tracción-compresión de dirección normal a la fuerza aplicada. En el caso de las fuerzas de torsión siempre aparecen fuerzas de corte

que se distribuyen por todo el hueso, siendo más intensas cuanto más alejadas están del eje.

En nuestro trabajo, mediremos las propiedades biomecánicas de las muestras óseas mediante el test de flexión a tres puntos.

La máquina de ensayos somete al objeto a una fuerza de magnitud conocida y mide los cambios en las dimensiones del mismo. Cuando se realiza un ensayo mecánico, se produce una curva carga-desplazamiento (*load-displacement*), que define la deformación total del objeto en la dirección de aplicación de la fuerza. La curva carga-desplazamiento se usa para medir la resistencia y la rigidez de una estructura, sin embargo, para comparar entre sí muestras o materiales distintos, se necesita estandarizar mediante curvas tensión-deformación (*stress-strain*). La carga y el desplazamiento se normalizan como tensión y deformación respectivamente utilizando las dimensiones del objeto. En las curvas se distingue una primera región en la que la tensión y la deformación son proporcionales (región lineal de la curva, que corresponde a la región elástica) y otra región en la que no se recupera la forma original de la muestra aunque deje de aplicarse la carga (zona plástica o de deformación irreversible) (Fig. 29).

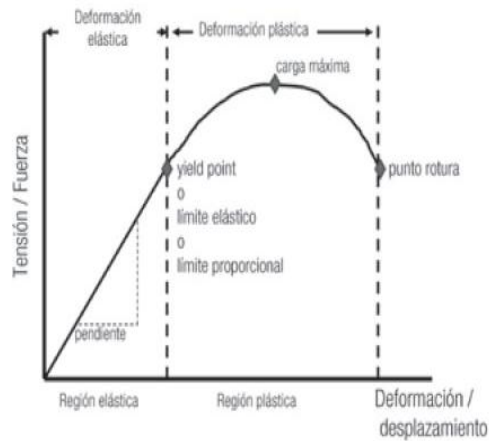


Figura 29: Curva tensión-deformación. *Martínez de Albornoz, P. Manual del residente COT.*

Partiendo de lo explicado en el punto anterior, las propiedades extrínsecas del hueso son las calculadas en la curva carga-desplazamiento, y dan información acerca de las propiedades estructurales del hueso que estamos analizando, pero que realmente no son comparables con las de otra muestra, ya que pueden influir variables externas como el tamaño del hueso.

Anteriormente se ha indicado que para cada tipo de hueso existen propiedades extrínsecas o estructurales e intrínsecas o materiales. Cuando se aplica una fuerza, el hueso sufre un desplazamiento o deformación y la relación entre la fuerza aplicada y el desplazamiento obtenido caracteriza las propiedades estructurales extrínsecas. Las propiedades intrínsecas son las obtenidas de la curva tensión-deformación, y ofrecen información de las propiedades materiales del hueso, totalmente comparables entre muestras. Generalmente, la fractura ósea se puede produ-

cir por la aplicación de una fuerza excesiva para la resistencia del hueso o por la presencia de una debilidad patológica del tejido. Por tanto, la fractura es resultado de un fallo material a nivel histológico que conduce a un fallo mecánico del hueso. Por esta razón, **en la evaluación de la resistencia ósea es importante analizar tanto las propiedades biomecánicas extrínsecas como las intrínsecas, y esto es lo que haremos en el presente trabajo.**

1.13. Osteoporosis

1.13.1. Definición

La definición de osteoporosis (OP), actualmente considerada por todos los expertos en este campo, fue acordada en una conferencia de consenso (NIH, 2001) [50], que la describe como una “*enfermedad generalizada del esqueleto caracterizada por masa ósea baja y alteración de la microarquitectura del hueso, con aumento de la fragilidad del mismo y consecuente tendencia a las fracturas*”.

En dicha definición se subrayan varios elementos: masa ósea baja, altera-

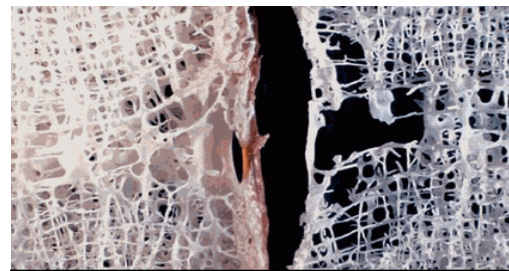


Figura 30: Hueso vertebral normal y hueso vertebral osteoporótico.

ción de la microarquitectura, aumento de la fragilidad y tendencia a las fracturas.

La OP es una enfermedad muy prevalente. Una de cada tres mujeres y 1 de cada 8 varones de más de 50 años se verán afectados por la OP en las próximas décadas [51]. Aunque las fracturas osteoporóticas afectan en gran medida a las mujeres mayores de 50 años, pueden afectar también a los hombres de mediana edad. Por ejemplo, en Europa el 15% de los varones a partir de los 65 años sufrirán una o más fracturas osteoporóticas a lo largo de su vida [52]. Las fracturas de cadera se consideran un problema de salud pública importante en numerosos países industrializados, en especial en Norte América, Europa, Australia y Asia, debido a que causan una gran morbilidad y elevados costes sanitarios [53].

En cuanto a su etiología, la OP es una enfermedad multifactorial, existiendo factores endógenos y exógenos que influyen en su patogénesis. Cuando la OP se ha establecido, el evento clínico identificable es la fractura osteoporótica, y al igual que ocurre en la enfermedad cardiovascular, existen factores de riesgo para la aparición de dichos eventos clínicos. Entre los factores de riesgo endógenos se encuentran la raza, los antecedentes familiares de OP, la geometría de la cabeza femoral y diversos polimorfismos en el gen que codi-

fica el receptor de la vitamina D y en los genes que codifican la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo I, etc. [54, 55].

Entre los factores de riesgo exógenos se encuentran la nutrición y el ejercicio, los niveles de hormonas sexuales y diversas enfermedades. La OP también se encuentra descrita como efecto adverso de tratamientos medicamentosos, como por ejemplo los glucocorticosteroides, los inhibidores de la aromatasa, etc.

1.13.2. Tipos de osteoporosis

Pese a que la OP es consecuencia de la interacción de múltiples factores y no se debe únicamente a una causa, se la suele clasificar etiológicamente en dos tipos: la OP primaria y la OP secundaria. Esta última está relacionada con factores desencadenantes identificables, como pueden ser otras enfermedades, fármacos, etc.

La OP primaria es la forma más frecuente de la enfermedad. A partir de los 30 años de edad en ambos sexos, comienza a disminuir progresivamente el remodelado óseo, teniendo como consecuencia una pérdida neta de masa ósea. En función del pico de masa ósea que ha alcanzado el sujeto en su juventud y los factores de riesgo que puedan acelerar la pérdida de hueso, tanto varones como mujeres podrán desarrollar OP (Fig. 31).

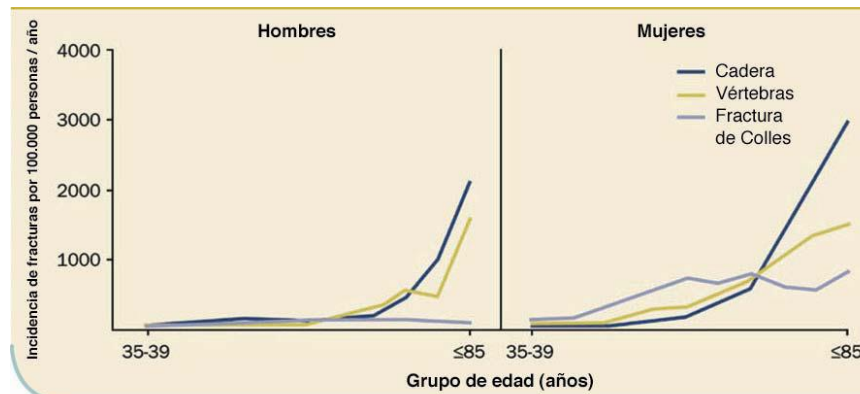


Figura 31: Incidencia de fracturas por 100.000 personas/años en varones y mujeres. Reproducido de Elsevier Science

Una de las causas más importantes de **OP en el varón** parece ser la disminución de los niveles de hormonas sexuales según va avanzando la edad. Los principales efectos de la deficiencia de testosterona son el incremento del volumen de hueso reabsorbido y la reducción del volumen de hueso formado [56]. El déficit de hormona sexual genera una pérdida de masa ósea que se manifiesta más tarde en el varón que en la mujer (Figura 31), aunque la morbilidad de la osteoporosis en varones es más alta. Se ha descrito que las consecuencias de la fractura osteoporótica son más devastadoras en el sexo masculino, ya que tras una fractura de cadera, sólo el 21% de los hombres recuperan un estilo de vida independiente, 26% requieren atención domiciliaria y el 53% son institucionalizados [53]

1.13.3. Tratamiento de la osteoporosis

En la actualidad, existen muchas opciones terapéuticas y tratamientos farmacológicos que actúan reduciendo el riesgo de fractura. Es importante que la

elección del tratamiento se ajuste a las necesidades médicas y al estilo de vida específico de cada paciente.

Los diferentes fármacos utilizados para combatir la OP se pueden clasificar en dos grupos principales, de acuerdo con su mecanismo de acción: los inhibidores de la resorción ósea o antirresortivos y los estimuladores de la formación ósea u osteoformadores. También se ha descrito un tercer tipo de fármacos que presentan acciones duales, consistentes en que pueden activar la formación ósea (aunque menos intensamente que los osteoformadores) y además inhiben la resorción, bloqueando la actividad osteoclástica. Esta última clase terapéutica tiene un único representante comercializado, el ranelato de estroncio. Este fármaco, debido a su mayor actividad antirresortiva (demostrada por su efecto sobre los marcadores de remodelado óseo) y sus indicaciones terapéuticas, se asemeja a los bifosfonatos. En la siguiente tabla (Tabla 4) se detalla la mencionada clasificación.

Tabla 4: Fármacos para el tratamiento de la OP

Grupo	Fármaco	Características
Inhibidores de resorción (Antirresortivos)	Calcitonina	Inhibe la actividad osteoclástica
	SERMs (moduladores del receptor estrogénico): <i>Raloxifeno, Lasofoxifeno</i>	Tienen efectos tejido específico: son agonistas de los estrógenos en hueso y antagonistas en mama
	Bifosfonatos: <i>Risedronato, Alendronato, Ibandronato, Zoledrónico</i>	Compuestos análogos a los pirofosfatos inorgánicos, inhiben la acción de los osteoclastos evitando la unión de éstos a la superficie ósea
	Denosumab	Actúa uniéndose al RANKL e impide su activación, inhibiendo la formación de osteoclastos
Osteoformadores	Teriparatida y PTH (1-84)	Son agentes anabólicos, que estimulan la formación de hueso cuando se administran de forma intermitente
Mecanismo dual	Ranelato de estroncio	Disminuye la diferenciación osteoclástica, aumentando la actividad osteoblástica y la síntesis de colágeno

1.13.4. Osteoformadores

La concentración plasmática de calcio debe controlarse estrictamente por el organismo, ya que este ión es crítico para numerosas funciones vitales, como la regulación de la señal intracelular de numerosas hormonas, la coagulación o la función muscular. La PTH y la vitamina D son las hormonas clave en este control.

La PTH humana es un polipéptido de 84 aminoácidos y su acción biológica radica en el extremo aminoterminal (Fig. 31). Sus tejidos diana son el hueso, el riñón y el intestino, y a través de ellos genera acciones biológicas que regulan la homeostasis del calcio y del fósforo. Estas acciones son la activación del remodelado óseo y la regulación de la excreción del calcio por vía renal [37]. Por tanto, su efecto principal en el organismo es la elevación de la calcemia.

La PTH también regula el fósforo plasmático aumentando su aporte desde el hueso e intestino, pero en el riñón aumenta la fosfaturia. El efecto dominante es este último, por lo que la PTH es una hormona hipofosfatemiante. Ello contribuye al efecto hipercalcemiante de la hormona, ya que la hipofosfatemia tiende a aumentar el calcio plasmático (Fig. 32). Además, contribuye al equilibrio ácido-básico compensando las acidosis metabólicas [37].

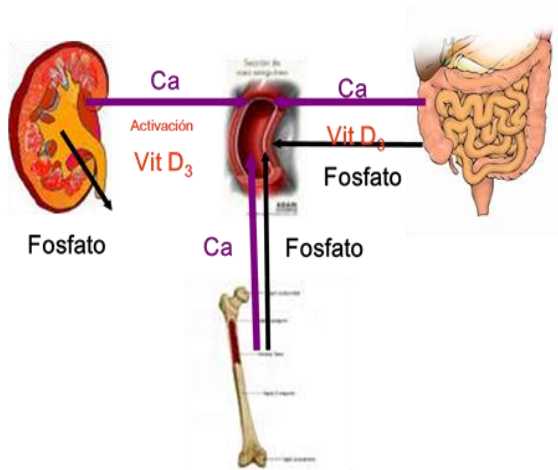


Figura 32: Efectos biológicos de la PTH sobre la vitamina D, el calcio y fósforo séricos

Los efectos de PTH en el crecimiento y la resorción ósea son paradójicos y complejos. Los niveles elevados de manera constante de la hormona ocasionan disminución de la DMO y elevación de la calcemia. Sin embargo, cuando se administran inyecciones una vez al día, el resultado es un aumento de la DMO. En el año 1929, Bauer, Aub y Albright observaron que la administración de PTH incrementaba el número de trabéculas óseas, observación confirmada por Selye tres años después. Los estudios clínicos en pacientes han demostrado que inyecciones diarias de 14,8 a 100 μg de PTH (1-34) (teriparatida) o PTH (1-84) entre 1 y 3 años, asociadas a la administración de vitamina D y calcio por vía oral, aumentan la DMO vertebral entre un 6,9% y un 32%, siendo sin embargo menos capaces de incrementar la DMO en el antebrazo, la cadera o la muñeca, ocurriendo incluso una disminución de la DMO en estas localizaciones [57].

Los efectos de PTH son mediados por un receptor específico transmembrana, (PTHr1), que se encuentra en las células de los túbulos renales y en los osteoblastos. Dicho receptor, se activa y cambia de configuración el momento en el que se une a él la molécula de PTH (Fig. 33). Este hecho inicia dos cascadas bioquímicas en la célula: la primera de inicia cuando aumenta la síntesis de cAMP, que conlleva a su vez la activación de la proteinkinasa A, y la segunda cascada genera un aumento de la entrada de calcio dentro de la célula, estimulando la vía de la proteinkinasa C y la activación enzimática. El mecanismo por el cual la PTH produce su acción anabólica todavía no se conoce, pero las distintas rutas utilizadas por esta hormona seguramente determinen una u otra acción [58, 59].

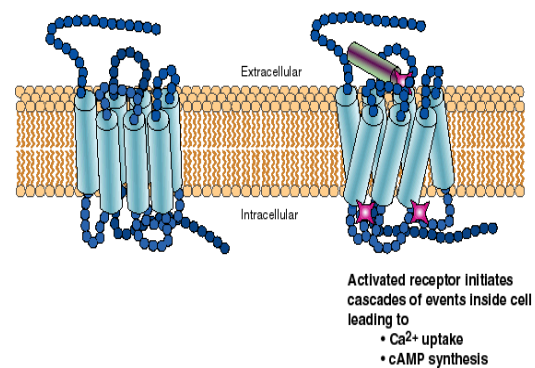


Figura 33: Activación receptor transmembrana de PTH. Reproducido de <http://www2.massgeneral.org/pubaffairs/releases/MGHosteoresrch.htm>

La PTH, por tanto, actúa directamente sobre el osteoblasto, y su acción anabólica está relacionada fundamental-

mente con esta célula. Los mecanismos propuestos para este efecto de la PTH son el incremento de la osteoblastogénesis, la disminución de la apoptosis osteoblástica, y la activación de las células de revestimiento. Además de la acción directa sobre el osteoblasto, la PTH actúa en la síntesis de una serie de factores de crecimiento y citoquinas, que, de forma indirecta, estimulan también la diferenciación y supervivencia de preosteoblastos y osteoblastos. Asimismo, PTH estimula la síntesis de IGF-I, que estimula a su vez la diferenciación osteoblástica, y también la síntesis de FGF-2, que tiene efectos antiapoptóticos y proliferativos sobre los precursores osteoblásticos [59].

Sin embargo, y este es el efecto paradójico de la hormona, incluso aunque la PTH sea administrada una vez al día o se reciba en infusión por un tiempo no superior a una hora, PTH es capaz de aumentar el ratio de expresión génica RANKL/OPG en las células del estroma de la médula ósea, con lo que también estimula la generación de osteoclastos, y por tanto un aumento de la resorción ósea [60, 61]. Por ese motivo, una exposición prolongada a PTH ocasionará una pérdida neta de masa ósea [62, 63].

El uso de PTH como agente anabólico en el tratamiento de la OP posmenopáusica es relativamente reciente. Existen dos formas farmacéuticas autorizadas para esta indicación: PTH (1-84), también llamada PTH humana recombinante de cadena completa, y PTH (1-34), o teriparatida. Esta última es un fragmento de la PTH humana correspondiente a los 34 primeros aminoácidos del extremo N-terminal (Fig. 33), que interactúan con el receptor PTHR1. En el caso de PTH (1-84), el péptido es idéntico al secretado por las glándulas paratiroides humanas en respuesta a una disminución de los niveles del calcio en sangre (Fig. 34). Tras la interacción de PTH (1-84) desde su extremo N-terminal con el receptor PTHR1, múltiples fragmentos producidos por hidrólisis proteica correspondientes al extremo C-terminal de la hormona quedan circulando en la sangre, siendo éstos péptidos la forma principal circulante de la hormona en condiciones fisiológicas. Recientemente se ha descubierto que existen también receptores C-terminales de PTH (C-PTHR), con los que interactúan dichos fragmentos. Según se ha descrito, la interacción de los fragmentos con los C-PTHR podría proteger el esqueleto al limitar la resorción ósea, aumentando en estas circunstancias la formación neta de hueso (Fig. 35) [64].

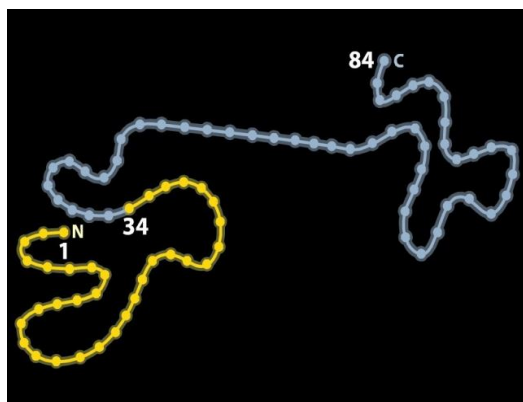


Figura 34: Representación de la cadena polipeptídica de la hormona paratiroidea humana, con los fragmentos N- (1-34) y C- terminales

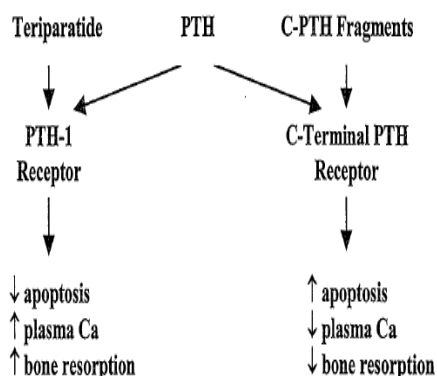


Figura 35: Receptores de fragmentos de PTH (1-34 o teriparatide y c-PTH. Esquema reproducido de Crannev et al. CMAJ • July 4, 2006 • 175 (1) 52-57

1.13.5. PTH recombinante humana de cadena completa (PTH 1-84)

La actividad anabólica de la hormona paratiroidea completa PTH (1-84) y del fragmento N-terminal de PTH (teriparatida) se han investigado durante muchos años [65]. Ambos han demostrado aumentar la DMO vertebral medida por densitometría [66]), al incrementar la cantidad neta de hueso trabecular, mediante un meca-

nismo de estimulación de la formación ósea [67]), aumentando como consecuencia los marcadores de formación y resorción ósea [68]). PTH (1-84) (Preotact®; Nycomed, Dinamarca) se obtiene mediante tecnología de DNA recombinante como una proteína de fusión. Procesos posteriores llevan al *clivaje* de la secuencia líder de la proteína, liberando la proteína madura resultante, esto es, una cadena polipeptídica simple de 84 aminoácidos (9.4 kDa), cuya secuencia es idéntica a la proteína endógena segregada por las glándulas paratiroides humanas [65]. La dosis autorizada en humanos para el tratamiento de la OP posmenopáusica con alto riesgo de fractura, es de 100 µg/día, administrados por vía subcutánea en el abdomen, durante un máximo de 2 años [69].

La eficacia antifractura de PTH (1-84) se demostró en el estudio *pivotal* de registro, realizado en 2.532 mujeres con alto riesgo de fractura, identificándose reducciones del 58% en el riesgo relativo de aparición de fracturas vertebrales nuevas frente a placebo, tras 18 meses de tratamiento, (Fig. 36), [70], eficacia que se ha considerado similar a la descrita para teriparatida, aunque este último principio activo ha demostrado adicionalmente resultados significativos en la reducción de la incidencia de fracturas no vertebrales en la misma población de pacientes, a diferencia de PTH de cadena completa.

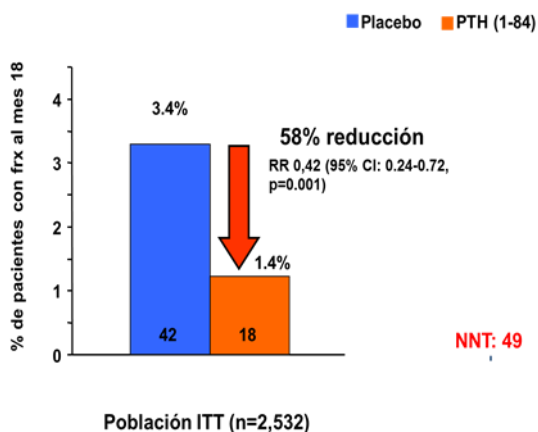


Figura 36: Estudio TOP (Greenspan et al, 2007): representación gráfica del resultado de la variable principal de eficacia (incidencia de fracturas vertebrales nuevas)

Posiblemente debido al número limitado de pacientes incluidos en los ensayos clínicos realizados con osteoformadores (entre 1.000 y 2.500), ninguno de los dos medicamentos han podido demostrar reducción de la incidencia de la fractura de cadera. Sin embargo, algunos datos publicados sugieren que PTH (1-84) mejora la resistencia ósea a nivel femoral [71]. El incremento en la densidad volumétrica y el volumen del hueso trabecular tras administración de un osteoformador se han hecho evidentes en la totalidad de los estudios publicados, y también se ha podido observar un aumento del volumen óseo en determinados lugares anatómicos de predominio de hueso cortical, por lo que se podría inferir una posible reducción del riesgo de fractura de cadera [72].

Los fármacos anabólicos se administran durante un máximo de 24 meses. Se ha objetivado que los cambios en

la DMO se evidencian entre los 6-12 meses de tratamiento. A partir de entonces, se produce un cambio en la pendiente de la curva de la ganancia de DMO, que responde a una disminución de la respuesta anabólica al fármaco. Observando los cambios en los marcadores de remodelado óseo, el incremento en la formación ósea comienza a manifestarse precozmente, a los 28 días del inicio del tratamiento. Aunque iniciándose los cambios un poco más tarde, los índices de resorción ósea también se encuentran elevados, manteniéndose dichos incrementos durante 6 meses de forma paralela a los de los marcadores de formación, (Fig. 37)

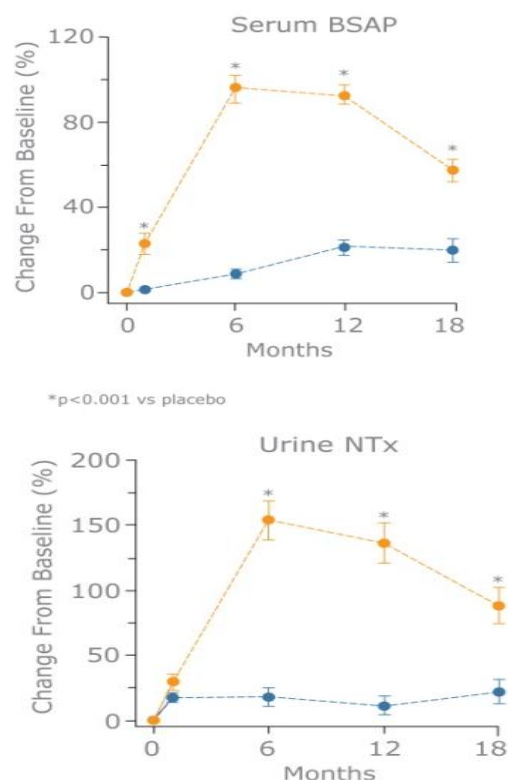


Figura 37: Estudio TOP (Greenspan et al, 2007) : Marcadores de formación (BSAP) y resorción (NTX). En amarillo, PTH (1-84); en azul, placebo

Estudios histológicos han mostrado que el incremento en la formación ósea relacionado con el uso de osteoformadores se debe principalmente a un aumento de la matriz sintetizada por los osteoblastos [73] (Fig. 38). El hueso tan rápidamente formado tarda en completar la mineralización secundaria, por lo que es un hueso joven, de histología normal y libre de microfracturas.

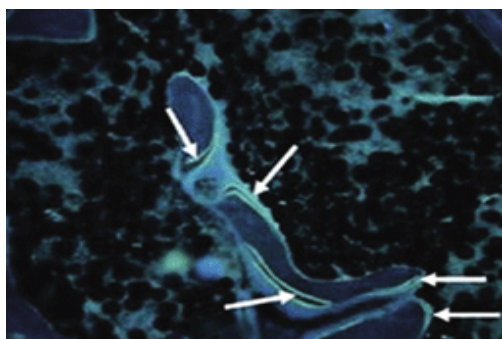


Figura 38: Biopsia ósea marcada con tetraciclina, tras tto. con PTH. Flechas: líneas de acumulo de osteoide *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1244-1253

1.13.6. Osteoformadores en la OP del varón

Teriparatida está indicada en el tratamiento de la OP del varón. Los datos de eficacia y seguridad del fármaco en esta indicación provienen de dos estudios realizados en un total de 460 varones con OP idiopática o por hipogonadismo, quienes fueron tratados con dosis entre 20 y 40 µg/día de teriparatida por vía subcutánea, obteniéndose incrementos medios de la DMO a nivel lumbar y del cuello femoral de

un 5,9% y 1,5% respectivamente [74,75]. No se han publicado datos de eficacia anti-fractura de teriparatida en OP masculina, ya que los estudios anteriormente nombrados no estaban diseñados para obtener diferencias entre los grupos (teriparatida frente a placebo) en la aparición de fracturas osteoporóticas. Tampoco existen en la actualidad datos publicados de uso de PTH (1-84) en modelos experimentales en animales o en pacientes varones.

En la investigación que es objeto de esta tesis, nos centraremos en estudiar los efectos de la hormona paratiroidea de cadena completa, PTH (1-84), sobre la densidad mineral y calidad ósea, utilizando un modelo de osteoporosis de varón, inducida por privación androgénica.

1.14. Modelos experimentales de osteoporosis

Tanto la OMS como la FDA americana han establecido en sus guías clínicas una serie de criterios para la utilización de los modelos animales en la evaluación pre-clínica de fármacos para el tratamiento de la osteoporosis [76-79]. Dado que la osteoporosis sólo ocurre de forma natural en humanos y en algunos primates, se hace necesario el uso de modelos experimentales para estudiar los efectos de los fármacos antes de proceder a las fases de desarrollo clínicas (en humanos). Las técnicas utilizadas para desarrollar osteoporosis en

animales de experimentación son las siguientes [79]:

Castración médica o quirúrgica (orquidectomía en machos). El cese de la función ovárica tanto en ratas como en perros y primates [80,81], parece ser el mecanismo más importante para inducir la OP. La rata orquidectomizada también es el modelo más idóneo para el estudio de la OP por déficit androgénico en el varón. La orquidectomía induce una pérdida sustancial del hueso trabecular en ratas maduras, y la baja masa ósea producida está asociada con un incremento en el remodelado óseo, como ocurre en los varones con hipogonadismo [82, 83,108].

Otros modelos experimentales:

1) Inmovilización prolongada, que produce pérdida de hueso trabecular y cortical. Los modelos de inmovilización incluyen tenotomía, sección nerviosa, sujeción de extremidades, fijaciones articulares y vuelos espaciales. **2)** Selección de razas de roedores con envejecimiento acelerado, para el estudio de la osteoporosis senil humana y **3)** Uso de fármacos osteopenizantes, p.e., corticosteroides.

1.15. Resumen y comentarios a la introducción

Como ya se ha comentado, el hueso es un tejido vivo y dinámico sometido a un continuo proceso de remodelado, exis-

tiendo un equilibrio entre el hueso reabsorbido y el hueso formado en condiciones fisiológicas. Este proceso es necesario no solo para la buena salud ósea, sino para mantener de manera adecuada la homeostasis del calcio y del fósforo en el organismo. Por esta razón, el metabolismo óseo se encuentra bajo una estricta regulación hormonal sistémica y local. Entre los factores humorales más importantes que regulan el remodelado óseo, están las hormonas sexuales y la PTH.

En la actualidad, está universalmente aceptado que el aumento de la fragilidad ósea está asociada al concepto de calidad. Este hecho condujo incluso a reconsiderar la definición de la OP, pasando a tener más peso en la valoración de los pacientes el concepto de calidad ósea que el de masa ósea.

La OP constituye un problema de salud pública, ya que las fracturas osteoporóticas están asociadas con una elevada morbilidad y suponen una partida importante dentro de los gastos de los sistemas sanitarios (23 billones de euros anuales en Europa). Como la población está experimentando progresivamente un aumento la esperanza de vida, el número de personas mayores aumentará y lo mismo hará el número de pacientes con OP [84]. De ahí la necesidad de desarrollar un conocimiento profundo de la etiopatogenia de la enfermedad y de su manejo, así como

potenciar la investigación en nuevos tratamientos que disminuyan el riesgo de fractura y mejoren la calidad de vida de los enfermos.

Tradicionalmente se ha considerado que la OP era una enfermedad propia de la mujer, y por ello los criterios diagnósticos se ajustaron a las mediciones de masa ósea en mujeres posmenopáusicas. Hoy se puede identificar la presencia de osteoporosis en el varón, los factores de riesgo son en parte diferentes a los de la mujer. En el varón, la presencia de factores de riesgo de OP secundaria, como pueden ser el alcoholismo, el tratamiento esteroideo y el hipogonadismo, vienen a constituir algo más del 50% de los casos. Asimismo, existen evidencias de que el déficit progresivo de andrógenos en el varón como consecuencia de la edad, conlleva un descenso de la masa ósea y un aumento del riesgo de fractura.

En las últimas décadas se han investigado y comercializado numerosos medicamentos dirigidos al tratamiento de la OP, con distintos mecanismos de acción y diferentes efectos sobre la masa y la calidad ósea. Los fármacos osteoformadores (PTH y análogos) se utilizan en clínica desde casi una década en el tratamiento de la OP posmenopáusica, y sin embargo todavía existen muchas cuestiones sin resolver en cuanto a su uso en distintas formas de

OP secundaria, o en otras poblaciones de pacientes.

Por todo lo anteriormente descrito, se hace necesario desarrollar líneas de investigación que identifiquen los efectos de los distintos fármacos sobre la DMO y la calidad del hueso formado, y en concreto de los osteoformadores [85], al ser fármacos recientemente incorporados al arsenal terapéutico, para así poder ofrecer a cada paciente y en cada caso la mejor terapia. Sin embargo, de todos es conocida la dificultad y los elevados costes que implica la realización de estudios en humanos, al tener que incluirse un gran número de pacientes para obtener tamaños muestrales que nos permitan alcanzar diferencias significativas entre grupos, garantizando a la vez el cumplimiento de la normativa ética y legal que ampara la investigación biomédica. En este sentido, la utilización de modelos experimentales de OP, como es la rata orquidectomizada, nos permite dar un primer paso en la identificación de nuevas líneas de investigación, y generar hipótesis que permitan diseñar posteriormente estudios en humanos con unas mayores garantías de éxito.

OBJETIVOS



2. Objetivos

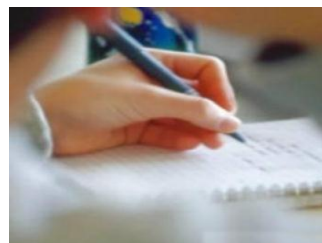
2.1. Objetivo 1

En un modelo experimental de osteoporosis inducida por depleción androgénica secundaria a orquidectomía en ratas macho adultas, identificar los cambios producidos en la cantidad y la calidad del hueso cortical y trabecular, mediante DXA y técnicas de análisis microestructural y ensayos biomecánicos de flexión a tres puntos.

2.2. Objetivo 2

Estudiar el efecto de PTH (1-84) en el modelo de anteriormente descrito, a través del análisis de parámetros relacionados con la cantidad de hueso (DMO) y calidad ósea (marcadores de remodelado, microarquitectura trabecular y cortical y propiedades biomecánicas), comparándolos con los resultados obtenidos en animales osteopénicos y controles sanos. Adicionalmente, se valorará la existencia de efecto dosis-respuesta, mediante el empleo de dos dosis del fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. Materiales y Métodos

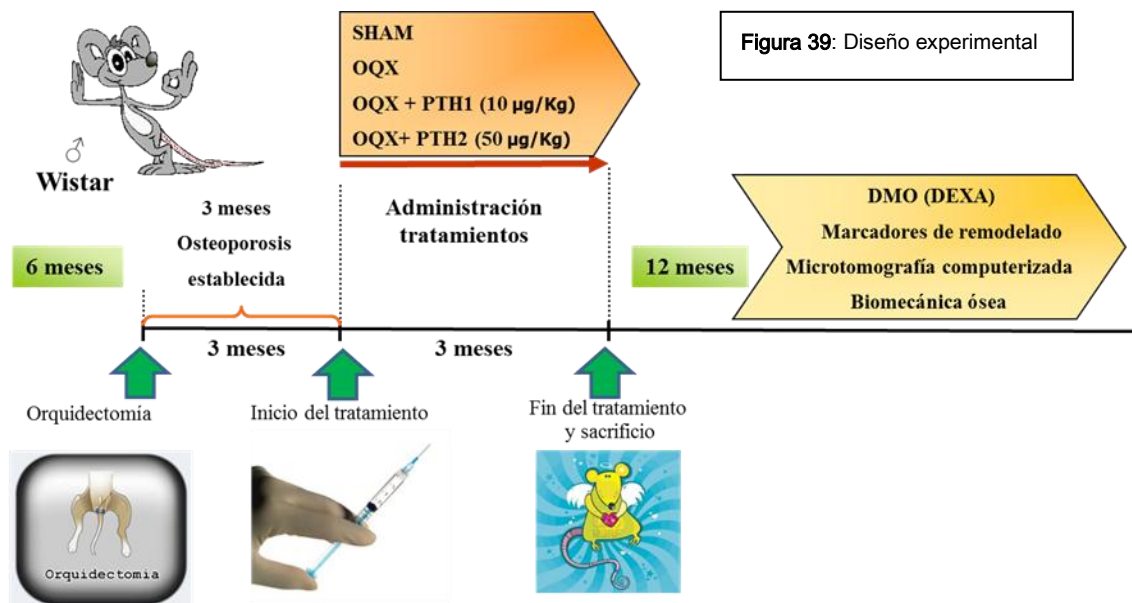
3.1. Diseño experimental

Se utilizaron 40 ratas Wistar macho de 6 meses de edad, con un peso medio al inicio del estudio de 445 ± 37 g (media \pm desviación estándar (DE)). A esta edad las ratas eran sexualmente maduras y habían terminado su crecimiento completamente. En ese momento, realizamos la orquidectomía (OQX) a un grupo de 30 ratas, y a otro grupo de 10 ratas se realizó una operación simulada (SHAM). Utilizamos como anestésico ketamina (40 mg/Kg, Ketolar®, Bayer) y xilacina (8 mg/Kg, Rompun®, Parke-Davis, Pfizer). Los animales se mantuvieron en el animalario bajo condiciones constantes de temperatura y luz (22° C, 12 horas de luz al día, en ciclos luz-oscuridad), proporcionándoles alimento (mezcla estándar del animalario) y agua *ad libitum*. Todos los animales se mantuvieron sin intervención terapéutica tras la

cirugía durante tres meses hasta el desarrollo de la OP por privación androgénica.

En la siguiente fase (administración del tratamiento) los animales se repartieron en los siguientes cuatro grupos: 1. Grupo SHAM, ratas a las que se realizó la operación simulada, (n= 10) y tres grupos de ratas orquidectomizadas (n=30): 2. Grupo OQX, 3. Grupo OQX+PTH1 y 4. Grupo OQX+PTH2, de 10 ratas cada uno (Fig. 38). Posteriormente, se administró el tratamiento: suero salino s.c. a las ratas de los grupos SHAM y OQX, 10 μ g/Kg de PTH (1-84) s.c., a las ratas del grupo ORX+PTH1 y 50 μ g/Kg de PTH (1-84) s.c. a las del grupo ORX+PTH2 (tabla 5). Todos los tratamientos se mantuvieron durante 3 meses. Una vez finalizado el periodo de tratamiento, los animales se sacrificaron, contando con 12 meses (Fig. 39).

Los animales fueron sacrificados por exanguinación tras ser anestesiados con



Estatus	N	Tratamiento	Dosis de PTH (microg/kg)	Duración (meses)
SHAM	10	-	0.0	3
OQX	10	-	0.0	3
OQX + PTH1	10	PTH 1	10	3
OQX + PTH2	10	PTH 2	50	3

Tabla 5: Dosis de los tratamientos y duración por grupos

éter. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca. La sangre extraída fue centrifugada a 3000 r.p.m. durante 15 minutos para la obtención del suero. El suero fue congelado a -80°C en forma de alícuotas hasta que se realizaron las determinaciones de los marcadores de remodelado óseo. Tras la obtención de las muestras de sangre, los animales fueron congelados a -20°C hasta la realización de las densitometrías óseas. Antes de la determinación de la DMO, los animales se mantuvieron durante 2 días a 4°C para su descongelación. Los fémures izquierdos fueron extirpados y el tejido adyacente eliminado, realizándose la densitometría *in situ*. En el mismo momento, se extirparon también los fémures derechos y se limpió minuciosamente el hueso de todos los tejidos blandos adyacentes, y se volvieron a congelar de nuevo, ya que era necesario para enviar las muestras a Trabeculae, empresa de base tecnológica, (Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Viñas, Ourense), para la realización de la microtomografía ósea computerizada (μCT) y análisis de parámetros biomecánicos. Tal y como se ha demostrado en estudios previos, los ciclos repetidos de congelación y descongelación

del hueso no alteran las propiedades biomecánicas óseas.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones del European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals. Para garantizar el cumplimiento de dichas recomendaciones y de la legislación española vigente en cuanto al empleo, protección y cuidado de los animales de experimentación (Real Decreto 1201/2005) [86], este proyecto experimental fue revisado y autorizado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Fundación Jiménez Díaz.

3.2. Preparación del tratamiento

La hormona paratiroidea humana recombinante de cadena completa, PTH (1-84) (Preotact®) fue proporcionada por el fabricante, Nycomed Pharma S.A. (Madrid, España). La forma farmacéutica en la que se suministró el fármaco fue la de un cartucho de vidrio con dos compartimentos, conteniendo 1,13 ml de disolvente (metacresol y agua destilada) y 1,61 mg de hormona paratiroidea humana liofilizada (Fig. 40). Para su reconstitución, extrajimos el disolvente con una jeringa

y lo instilamos en el compartimento que contenía la hormona.



Figura 40: Cartucho de Preotact®

Esta “solución madre” presentaba una concentración de hormona paratiroidea de 1,42 µg/ml. Para preparar las dos dosis diferentes de PTH, se extrajo del cartucho la concentración madre y se diluyó, añadiendo suero salino para obtener dos concentraciones: PTH1, conteniendo 5µg/100µL, y PTH2, conteniendo 25 µg/100 µL. Después, se realizaron alícuotas de 1 ml, conteniendo la cantidad de PTH adecuada para cada día y número de ratas, y se procedió a su liofilización para almacenarlas a 4 °C. Cada día, utilizábamos una alícuota liofilizada, que se resuspendía en suero fisiológico a un volumen tal que al administrar 200µL de cada una de las dos soluciones resultantes a los animales, inyectábamos 10 ó 50 µL de PTH (1-84) a nuestras ratas, en función de la dosis que les correspondiese por el grupo al que pertenecían. A los animales de los grupos OQX y SHAM se les administraron 200µL/día de suero salino, para que actuaran como grupos control sano (SHAM) y control osteoporótico no tratado (OQX).

3.3. Determinación de la DMO

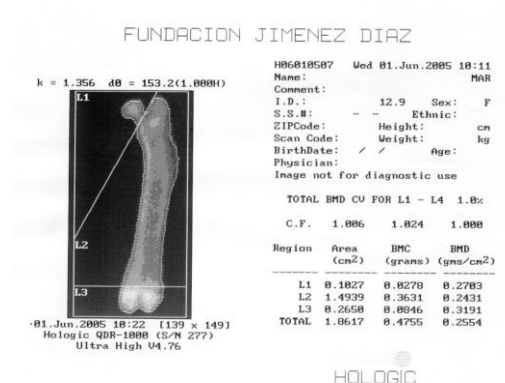


Figura 41: Imagen representativa de una densitometría femoral

Utilizamos un densitómetro que se utiliza en clínica para medir la DMO, al que adaptamos un colimador de rayos de 1 mm para que pudiera ser utilizado para medir huesos de pequeño tamaño [87]. Además, las densitometrías se analizaron con un programa informático de alta resolución especial para el análisis de DMO en pequeños animales, que permite incrementar tanto el número de líneas escaneadas, siendo el espacio por línea de barrido de 0,0254 cm, como el número de puntos de resolución (resolución de cada punto de 0,0217 cm). Los coeficientes de variación de esta técnica son de 0,53–1,2% (Figs. 41 y 42).

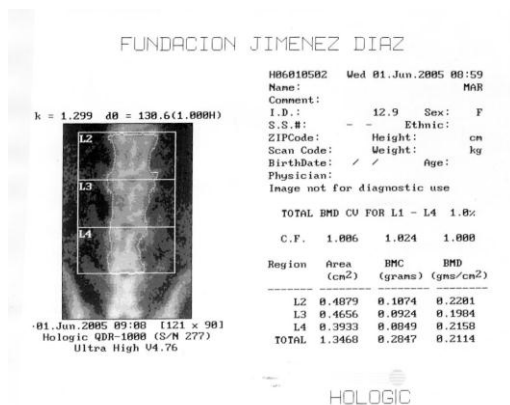


Figura 42: Imagen representativa de una densitometría lumbar

Las densitometrías se realizaron en la columna lumbar, a nivel de las vértebras L2, L3 y L4, y en todo el fémur izquierdo tras su extracción. Se calculó la DMO total, que resultaba de la media de los valores analizados en cada región, y los resultados se expresaron como la media y DE de los valores obtenidos.

El densitómetro se calibraba diariamente con el objeto de mantener unas óptimas condiciones de reproducibilidad y calidad en la medida, siempre dentro del rango de los valores recomendados por el fabricante. La reproducibilidad de las mediciones *in vitro* fue testada mediante un fantoma antropomórfico de composición mineral conocida (s/n Q-239, Hologic®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El coeficiente de variación *in vitro* durante el período de estudio fue <0,58 % para la DMO.

3.4. Análisis de la microarquitectura

Se escanearon las porciones distales de los fémures derechos con un mi-

crotomógrafo computarizado (μ CT) Skyscan 1172 (Skyscan NV. Aartselaar, Belgium) (Fig. 43). Como se ha comentado, esta técnica fue realizada en las instalaciones de Trabe- culae® en Ourense.



Figura 43: Equipo Skyscan 1172

Inicialmente se realizaron unas primeras imágenes de prueba de las muestras durante 30 minutos, con diferentes intensidades y filtros, y tras analizarlas, se decidió utilizar por su mejor resolución y para todas las muestras un voltaje del tubo de rayos X de 100 kV e intensidad de 100 μ A, empleando un filtro de aluminio de 1 mm de espesor. Finalmente se procedió al escaneado definitivo de las muestras, en la que el tiempo de exposición a los rayos X fue de 1010 milisegundos. Las imágenes fueron tomadas en sentido longitudinal, y la muestra fue rotando en este mismo sentido hasta completar 185°, realizando dos imágenes longitudinales cada 0,45° de giro.

Con el objetivo de mejorar la calidad de los datos, se obtuvieron dos imágenes para cada posición angular, que fueron procesadas y transformadas por los equipos

informáticos en una nueva y única imagen media. A este proceso se le conoce como *averaging*. El tamaño del voxel, (mínima unidad de imagen tridimensional procesable) fue de $11 \mu\text{m}^3$. De esta forma se obtuvieron 400 imágenes tomadas a la máxima resolución del aparato, 1024 x1280 pixels, en formato TIFF a 16 bits de profundidad, es decir 64000 niveles en la escala de grises y 3,5 Megabytes (MB) de memoria por imagen. Los datos obtenidos del escáner fueron reconstruidos utilizando el algoritmo de Feldkamp modificado [88], y se realizó una segmentación para transformarlos en imágenes binarias de 8 bit en formato bmp, utilizando un umbral adaptativo local.

3.4.1. Reconstrucción de imágenes

Para realizar el análisis cuantitativo, las imágenes se procesaron informáticamente y se realizó una reconstrucción tridimensional a partir de las imágenes longitudinales, para poder analizarse la estructura ósea interna de cada muestra desde cualquier ángulo.

Las imágenes fueron reconstruidas en sentido transversal y en formato bmp, con 8 bits y 256 niveles en la escala de grises, obteniéndose un total de 953 imágenes por cada muestra, cada una de las cuales ocupaba 1,2 MB de memoria.

3.4.2. Selección del volumen de interés y región de interés

Para analizar las propiedades microestructurales de las regiones de hueso trabecular y cortical, se procedió a seleccionar el volumen de interés (VOI), es decir, la región de la muestra que sería posteriormente analizada.

Para el análisis del hueso trabecular distal del fémur, se seleccionó un VOI de 2,50 mm de largo, medido a partir de un milímetro desde la placa de crecimiento en dirección proximal (Fig. 44).

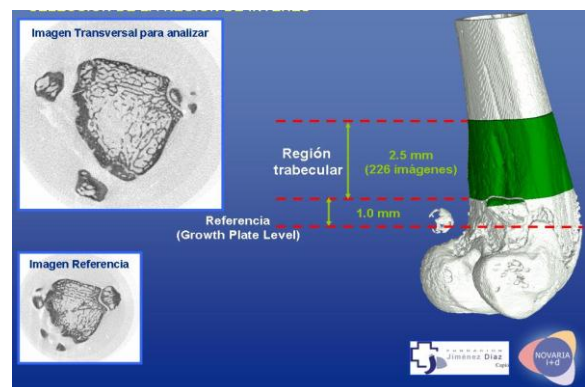


Figura 44: ROI para el estudio del hueso trabecular del fémur

Se analizaron un total de 226 imágenes transversales, es decir una imagen cada $11 \mu\text{m}$ de distancia (igual al tamaño del voxel), utilizando así toda la potencia del escáner previo.

Para el análisis de las propiedades microestructurales del hueso cortical o trabecular del fémur, se seleccionó una región de interés (ROI) de 1 mm, medida a 4 mm de

la placa de crecimiento en dirección a la metafisis ósea. Se analizaron un total de 91 imágenes transversales, es decir, de nuevo una imagen cada 11 μm .

Una vez seleccionadas las imágenes de la región que se van a analizar, se procedió a dibujar a mano alzada la zona exacta del análisis, para identificar en cada análisis la zona cortical o trabecular, según correspondiese.

Posteriormente se binarizó la imagen (Fig 45), para transformar la escala de grises en una imagen dicromática (blanco y negro).

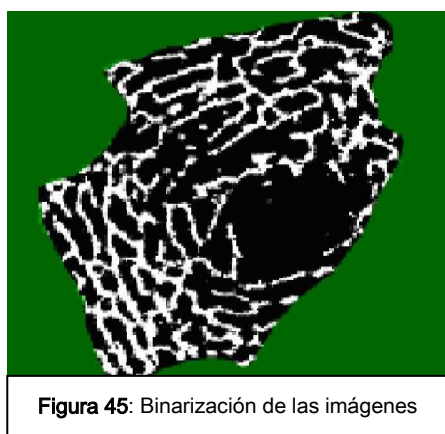


Figura 45: Binarización de las imágenes

La imagen superior corresponde a la región de hueso trabecular de la epífisis distal del fémur. Durante el proceso de binarización y para poder realizar el posterior análisis informático, cada pixel y cada voxel es reconocido por el ordenador como: 1: "con hueso", que corresponden a las áreas blancas de la figura, o 0 "sin hueso", representadas por las áreas negras de la figura.

Con la ROI binarizada, se procedió al análisis cuantitativo de la misma, utilizando un modelo tridimensional para el hueso trabecular e imágenes transversales bidimensionales para el hueso cortical, utilizando el software comercial CT-analyzer, versión 1.7.0, que el fabricante proporciona con el equipo SkyScan™.

3.4.3. Análisis de la región trabecular

Los índices morfométricos de la región trabecular se determinaron a partir de los datos microtomográficos usando morfometría directa en 3D. El volumen total de tejido (TV, mm^3) y el volumen trabecular óseo (BV, mm^3) fueron calculados utilizando cubos hexaédricos como relleno de la imagen. El cociente BV/TV (%) se calculó directamente a partir de dichos parámetros. El espesor trabecular (Tb.Th; mm), la separación trabecular (Tb.SP; mm) y el número de trabéculas (Tb.N; 1/mm) se midieron directamente sobre las imágenes en 3D usando métodos descritos previamente en la literatura [89,90]. Las medidas del espesor trabecular se calibraron escaneando y analizando tres hojas de aluminio con espesores de 50, 125 y 250 μm . Los índices no métricos, índice estructural del modelo (SMI) y factor de patrón óseo trabecular (Tb.Pf, 1/mm) se calcularon también a partir del modelo en 3D.

El SMI indica la prevalencia relativa de *rods* (tubos) y *plates* (placas) y nos informa sobre la morfología de las trabéculas

[91]. El Tb.Pf mide la convexidad o concavidad relativa de la superficie ósea total [92] y es un índice de conectividad inversa. El grado de anisotropía (DA) representa la anisotropía trabecular, definida como el cociente entre el radio máximo y mínimo de la longitud media de intercepción. Se trata de una variable adimensional [93]. En el apartado 1.10.2.1 de la introducción se ha detallado el fundamento de todos los índices morfométricos.

El coeficiente de variación aceptado de todas las medidas anteriormente reseñadas fue menor del 5%.

3.4.4. Análisis de la región cortical

El análisis de la región cortical se realizó a través de imágenes transversales en dos dimensiones. Se analizaron un total de 160 cortes, comenzando a una distancia de 4,00 mm de la placa de crecimiento, extendiéndose longitudinalmente 1,00 mm. Se estudió el área transversal total media (B.Ar; mm²) y el momento polar de inercia medio (MMI; mm⁴), que es una función transversal bidimensional que representa un índice de resistencia básico, y predice la capacidad de los objetos de sección transversal circular y ninguna deformación significativa para resistir la torsión, lo que se asume para la sección transversal de la región cortical analizada. Se utilizó igualmente el software del escáner SkyScan®.

Como en el caso de las medidas del hueso trabecular, el coeficiente de variación aceptado para los parámetros corticales fue menor del 5%.

3.5. Análisis de las propiedades biomecánicas

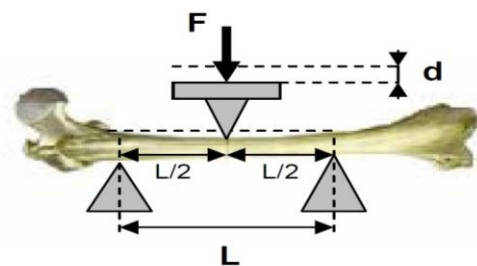
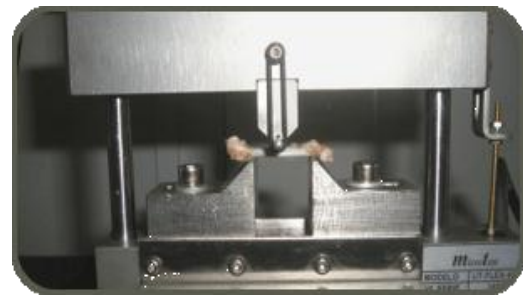


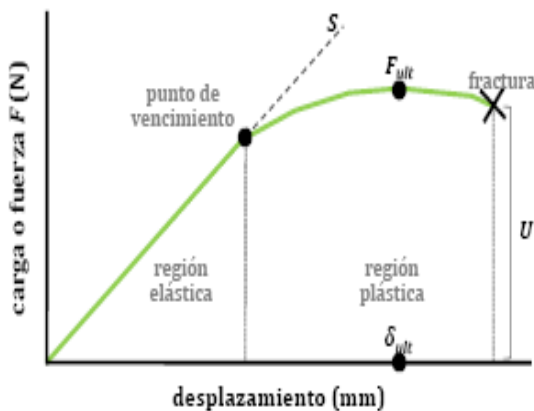
Figura 46: Representación esquemática del test mecánico de flexión a 3 puntos e imagen de la aplicación real del test

Como comentamos, extrajimos el fémur derecho para la determinación de las propiedades biomecánicas. Para realizar el test mecánico se empleó una máquina Microtest® EM 1/10/FR/ m (Microtest, S.A, Madrid, Spain), y se procediendo a hacer una prueba de flexión a tres puntos (Fig. 46), en la que $L=15\text{mm}$. El lugar de aplicación de la fuerza en los ensayos mecánicos de flexión a tres puntos es el punto medio de la diáfisis de los huesos largos. Los cabezales de los soportes son redondeados para evitar aplicar fuer-

zas de corte en el hueso. El procedimiento de colocación de la muestra es sencillo: colocamos el fémur horizontalmente centrado sobre los soportes y la fuerza se aplica de manera vertical en un punto equidistante de los dos soportes. Se aplicó una fuerza constante de 3 kN/s hasta la rotura.

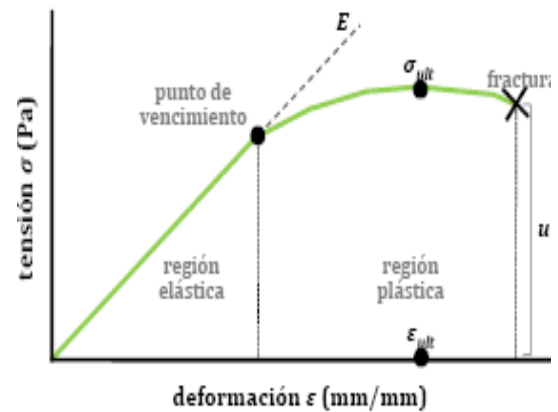
Con los datos del test, se realizaron curvas carga-desplazamiento para cada muestra. En la figura 47 se representa una curva carga-desplazamiento, en la que se miden fuerza y desplazamiento máximos (F_{ult} y δ_{ult}), además de calcularse el trabajo de rotura (U , área bajo la curva) y la rigidez extrínseca (S , pendiente de la curva en la región elástica).

Figura 47: Curva carga-desplazamiento



Una vez normalizada la curva anterior aplicando las dimensiones de la muestra, obtuvimos la curva tensión-deformación (Fig. 48), en la que calculamos la tensión y deformación máximas (σ_{ult} y ϵ_{ult}), mientras que el área bajo la curva es la dureza (u) y la pendiente de la región elástica es el módulo de Young aparente [94].

Figura 48: Curva tensión-deformación



F_{ult} se define como la fuerza de flexión en el momento del fracaso mecánico y δ_{ult} como el desplazamiento en ese mismo punto. σ_{ult} y ϵ_{ult} se definen como la tensión y la deformación en ese mismo punto de fractura. U es el área bajo la curva carga-desplazamiento hasta el momento de fractura, y u es el área bajo la curva de tensión-deformación hasta el punto de fractura. Asumiendo que el hueso tiene un comportamiento lineal elástico, ϵ y σ se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones [95-97]:

$$\sigma = FLc / 4I$$

$$\epsilon = \delta(12c / L^2)$$

donde F es la carga (Fuerza), δ es el desplazamiento, L es la distancia entre los puntos de apoyo, c es la mitad del diámetro menor exterior de la sección del hueso en el punto de aplicación de la fuerza, e I es el momento de inercia de la elipse que conforma la corteza en dicho punto.

El momento de inercia (I) se calcula mediante la siguiente expresión [95-100]:

$$I = \frac{\pi}{64} [(x_1 y_1^3) - (x_2 y_2^3)]$$

donde x_1 es el diámetro mayor externo de la sección en el punto de aplicación de la fuerza, y_1 es el diámetro menor externo, x_2 es el diámetro mayor interno e y_2 es el diámetro menor interno (Fig. 49)

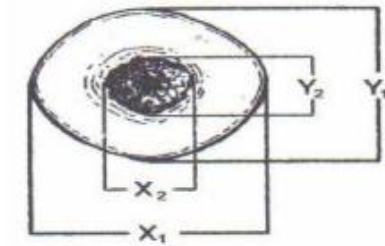


Figura 49: Sección transversal de la diáfisis de un hueso largo (fémur)

Las propiedades biomecánicas extrínsecas que hemos estudiado en este trabajo son:

- fuerza máxima (Fult),
- desplazamiento máximo (δ_{ult})
- rigidez (S)
- trabajo de rotura (U).

Las propiedades biomecánicas intrínsecas estudiadas son:

- tensión máxima (σ_{ult})
- deformación máxima (ϵ_{ult})
- módulo de Young (E)
- dureza (u)

3.6. Determinaciones de los marcadores de remodelado óseo

3.6.1. Osteocalcina

La determinación de la BGP o *Bone Gla-Protein* en suero se realizó mediante la técnica de *enzyme linked immunoassay*, ELISA, (Rat-MID™ Osteocalcin, IDS, UK). El anticuerpo monoclonal utilizado se une a la porción media de la molécula. Aunque se trata de un anticuerpo anti-osteocalcina humana se ha demostrado su antigenicidad con osteocalcina de rata purificada. La técnica inmunoenzimática ELISA forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. El ELISA se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato (Fig. 50).

Metodología: Los pocillos de la placa de ELISA se recubren con estreptavidina y se añade osteocalcina unida a biotina, que se une a los pocillos, al formarse el complejo estreptavidina-biotina, durante la etapa de preincubación. Tras una fase de lavado, se

Figura 47: Sección transversal de la diáfisis de un hueso largo (fémur)

añaden los controles, muestras y calibradores así como el anticuerpo anti-osteocalcina. En la siguiente etapa de incubación, el anticuerpo se unirá en mayor o menor proporción a la osteocalcina de la placa, en función del contenido de osteocalcina de cada muestra. Posteriormente se realiza un lavado y luego se añade un anticuerpo anti-IgG unido a peroxidasa, que se unirá al anticuerpo anti-osteocalcina de la placa. Por último se añade un sustrato cromogénico, la tetrametilbenzidina, que produce una reacción coloreada con la peroxidasa. Se lee la absorbancia a 450 nm. El color es inversamente proporcional a la cantidad de osteocalcina de la muestra. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son $< 5.0\%$ y $< 5.5\%$, respectivamente. La sensibilidad de este ELISA es de 50 ng/ml.

3.6.2. CTX

Las determinaciones del telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX) en suero se realizaron mediante una técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) comercial específico para CTX de rata (RatLaps™ ELISA, IDS, UK). Este ensayo es un ELISA competitivo, en el que se utiliza un antígeno sin-



tético (EKSQDGGR) biotinilado, similar al CTX de rata, y dos anticuerpos, un Ac primario policlonal de conejo, y un Ac secundario anticonejo conjugado con peroxidasa.

Metodología: Se realiza una preincubación con el antígeno sintético biotinilado en una placa que contiene estreptavidina. Después, se lava la placa y se añade el suero a estudio y a continuación se añade el anticuerpo primario. Durante la incubación, el antígeno sintético unido a la placa competirá con el CTX soluble de la muestra por unirse al anticuerpo (Fig. 51). Después, se vuelve a lavar para retirar todos los compuestos solubles (incluyéndose las uniones Ac-CTX y anticuerpos sin unir), y se añade el anticuerpo secundario, que es específico del fragmento constante del anticuerpo primario (de conejo) y que está conjugado con peroxidasa. Por último, se revela el ELISA mediante un sustrato cromogénico de la peroxidasa, y la reac-

Figura 50: Muestra de revelado del ELISA para CTX: En 1ª línea vertical está el suero control (+) y en la 2ª el (-). Los sueros problema por duplicado han sido colocados en el resto de la placa.

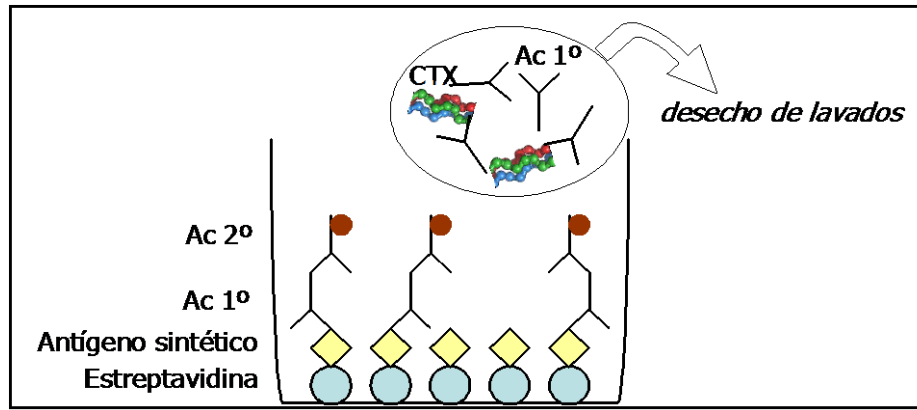


Figura 51: Técnica ELISA específica CTX murina RatLaps®

ción se para con ácido sulfúrico. Se mide la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia medida será inversamente proporcional a la concentración de CTX de la muestra. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son $< 5,6 \%$ y $< 10,5 \%$, respectivamente. La sensibilidad de este ELISA es de 2 ng/ml.

3.6.3. Isoenzima 5b de la TRAP

La TRAP5b en suero se determinó mediante una técnica ELISA comercial específica para ratas (RatTRA® Assay, IDS, UK).

Metodología: Se incubaron anticuerpos monoclonales anti-TRAP-5b en los pocillos de la placa de ELISA recubiertos de IgG. Dicho anticuerpo se une a la IgG de los pocillos. Después de una etapa de lavado, los calibradores, controles y sueros problema se añaden a los pocillos y se incuban, uniéndose la TRAP-5b presente en dichas muestras al anticuerpo anti-TRAP-5b. La actividad TRAP-5b se determina con un sustrato cromogénico (p-nitrofenil fosfato), produciéndose un color amarillo proporcional a la canti-

dad de enzima presente en la muestra. La reacción se detiene añadiendo a los pocillos hidróxido sódico 0,32 M. La absorbancia se lee a 405 nm. La sensibilidad del ensayo es de 0,1 U/L. Los coeficiente de variación intra- e inter-análisis son $< 5\%$ y $< 5,5\%$ respectivamente.

3.7. Análisis Estadístico

Los resultados de las variables medidas se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) en los diferentes parámetros. Se realizó un análisis no paramétrico mediante el método de Mann-Whitney (Medcalc Software Program®, Belgium), para comparar los diferentes grupos de tratamiento. Se aceptó que un valor de $p < 0.05$ demostraba diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS



4. Resultados

4.1. Cambios en el peso de los animales tras la orquidectomía

En nuestro experimento, partimos de un peso medio inicial de los animales a una edad de 6 meses de 430 gramos, que aumentó hasta los 560 gramos en los animales del grupo SHAM a la edad de 9 meses. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de las ratas del grupo

SHAM y el de las ratas OQX no tratadas ($p=0,004$), que llegaron a ser de un 13% menores a los 6 meses de la orquidectomía. Sin embargo, el grupo de animales que recibieron la dosis de 10 $\mu\text{g/Kg}$ (OQX+PTH1), presentó un peso medio mayor que el grupo OQX, sin que existieran diferencias significativas con el grupo control (SHAM). Por el contrario, el grupo OQX+PTH2 que recibió la dosis alta de PTH, presentó un peso medio similar al grupo OQX (Fig. 52).

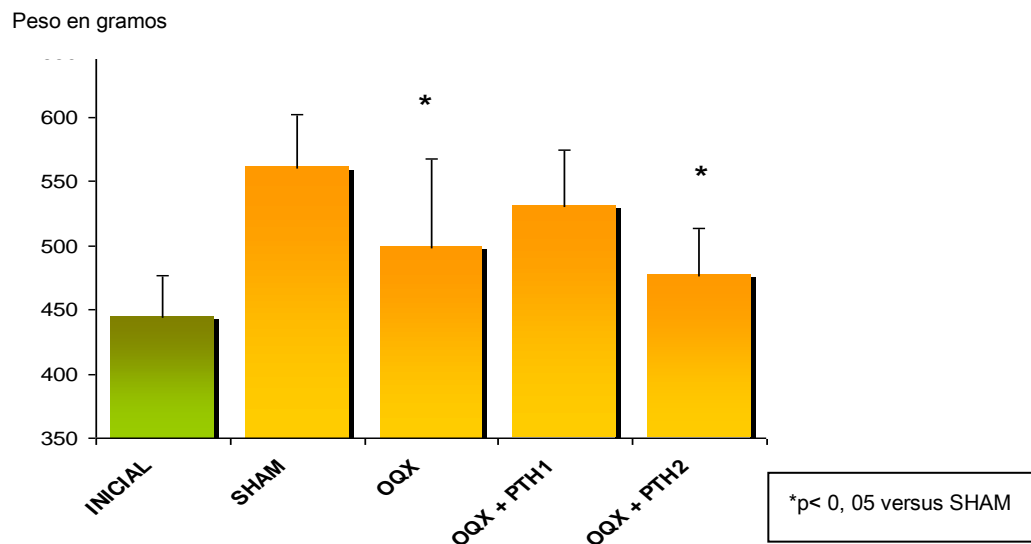


Figura 52. Peso medio de las ratas Wistar macho utilizadas en el experimento, a los 6 meses de edad (Inicial) y a los 12 meses de edad en los siguientes grupos: ratas a las que se realizó la cirugía simulada (SHAM), ratas castradas (orquidectomía: ORX) y ratas castradas tratadas durante 3 meses con PTH 10 $\mu\text{g/Kg/día}$ (ORX+PTH1) y PTH 50 $\mu\text{g/Kg/día}$ (ORX+PTH2).

4.1. Cambios en la cantidad ósea

Comparando los grupos OQX y SHAM, observamos una disminución significativa de la densidad mineral femoral (DMOF) y lumbar (DMOL), 11% ($p < 0.0001$) y 13% ($p < 0.0001$), respectivamente.

La dosis de $10 \mu\text{g/Kg/día}$ de PTH (1-84), generó un incremento significativo de la DMOF (4.8%, $p < 0.05$) y de la DMOL (9.4%, $p < 0.005$) comparadas con el grupo OQX.

Adicionalmente, pudimos comprobar que la administración de la dosis alta ($50 \mu\text{g/Kg/día}$) de PTH (PTH2) recuperó totalmente la DMOF ($p < 0.001$; vs grupo OQX) y la DMOL ($p < 0.01$; vs OQX), de manera que los valores de DMO fueron similares a los que presentaron los animales del grupo SHAM. (Fig. 53 y Tabla 6).

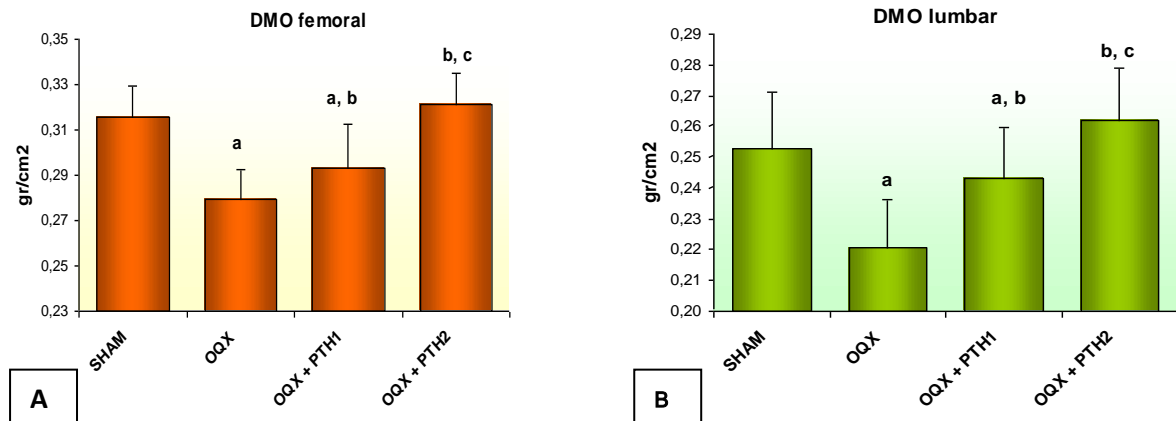


Figura 53. Medida de DMO por DEXA (g/cm^2) medida en (A) fémur (DMOF) y (B) vértebra lumbar (DMOL); Las ratas de 6 meses de edad fueron distribuidas en 4 grupos: Cirugía simulada (SHAM), ratas operadas no tratadas (OQX), ratas operadas tratadas 3 meses con PTH (1-84) $10 \mu\text{g/Kg/día}$ (OQX+PTH1) y PTH (1-84) $50 \mu\text{g/Kg/día}$ (OQX+PTH2), comenzando 3 meses después de la cirugía. Los datos están expresados como media+ DE en grupos de 10 animales. Significación estadística $p < 0.05$: (a) vs. SHAM; (b) vs. OQX; (c) vs. OQX+PTH1.

Grupo	FBMD		LBMD	
	Media	SD	Media	SD
SHAM	0,3154	0,0140	0,2530	0,0181
OQX	0,2794	0,0129	0,2205	0,0159
OQX + PTH1	0,2933	0,0192	0,2433	0,0164
OQX + PTH2	0,3210	0,0141	0,2621	0,0167

Comparaciones	T-test (p-value)	
	FBMD	LBMD
SHAM vs OQX	<0,0001	0,0001
SHAM vs PTH1	0,0055	0,205
SHAM vs PTH2	0,2351	0,1009
OQX vs PTH1	0,055	0,0037
OQX vs PTH2	<0,0001	<0,0001
PTH1 vs PTH2	0,001	0,0073

Tabla 6. Resultados media, DE y análisis estadístico (T-test) de DMO en hueso femoral (FBMD) y vértebra lumbar (LBMD), expresado en gr de calcio /cm². Comparaciones; Grupos control (cirugía simulada, SHAM), orquidectomizadas (OQX), y tratadas con dos dosis de PTH (1-84), (PTH1 y PTH2). En rojo, $p < 0,05$

4.2. Cambios en la calidad ósea

4.2.1. Microarquitectura trabecular

Seis meses tras la cirugía, la mayoría de las variables que caracterizan la microestructura ósea en el hueso trabecular, identificadas por microtomografía computerizada, presentaron cambios significativos en el grupo de animales OQX respecto del grupo SHAM. Se midieron los siguientes parámetros: cociente volumen óseo/volumen total (BV/TV) en %, número de trabéculas (Tb.N), separación trabecular (Tb.S), factor de patrón trabecular (Tb.Pf), índice de estructura del modelo (SMI) y grado de anisotropía (DA). Las ratas castradas presentaron una disminución significativa de BV/TV en el fémur distal ($p < 0,05$). Se observó que la disminución del índice BV/TV estaba relacionado con un incremento significativo de Tb.Sp, y a la vez con una disminución significativa de Tb.N.

La dosis alta de PTH (1-84) revirtió los cambios ocurridos por la OQX, de manera que los valores de BV/TV, Tb.Sp y Tb.N tras el tratamiento fueron similares a los que presentó el grupo SHAM. Por lo que respecta a la dosis baja de PTH, recuperó el valor de

BV/TV, pero no se observaron diferencias significativas en los valores de Tb.Sp y Tb.N vs SHAM, aunque sí se vio un aumento de los mismos y una tendencia a alcanzarlos.

La OQX también ocasionó cambios significativos en otras variables no paramétricas. El SMI aumentó significativamente debido a la OQX, lo que indica que el hueso trabecular se modificó desde una estructura basada en placas a una basada en tubos. El tratamiento con PTH revirtió este efecto que ocurrió en las ratas OQX. El índice Tb.Pf se incrementó igualmente en el grupo OQX, indicando una baja conectividad trabecular. En comparación con el grupo OQX, los animales que recibieron tratamiento demostraron una disminución significativa de este parámetro. El DA no experimentó cambios significativos entre los distintos grupos, ni entre los grupos SHAM y el OQX, ni entre los grupos tratados y el grupo SHAM o OQX (Tabla 7 y Fig. 54).

Grupo	test	BV/TV (mm^{-1})	Tb Sp (mm)	Tb N (mm^{-1})	Tb Pf (mm^{-1})	DA	SMI
A: SHAM	Media	18,0	0,44	1,86	5,89	0,43	1,37
	DE	02,78	0,10	0,37	2,59	0,01	0,34
B: OQX	Media	9,38	0,84	0,86	8,24	0,40	1,74
	DE	3,48	0,15	0,32	1,98	0,02	0,28
C: OQX+PTH1	Media	15,25	0,67	1,26	5,08	0,39	1,43
	DE	3,55	0,11	0,26	1,54	0,02	0,31
D: OQX+PTH2	Media	18,02	0,65	1,56	1,69	0,42	1,05
	DE	3,69	0,21	0,57	2,37	0,02	0,37
	$p < 0.05$	B vs A C,D vs B	B,C vs A	B,C vs A D vs B	B vs A C,D vs B	ns	D vs B

Tabla 7. Resultados media y DE de los parámetros microestructurales de las secciones de hueso trabecular

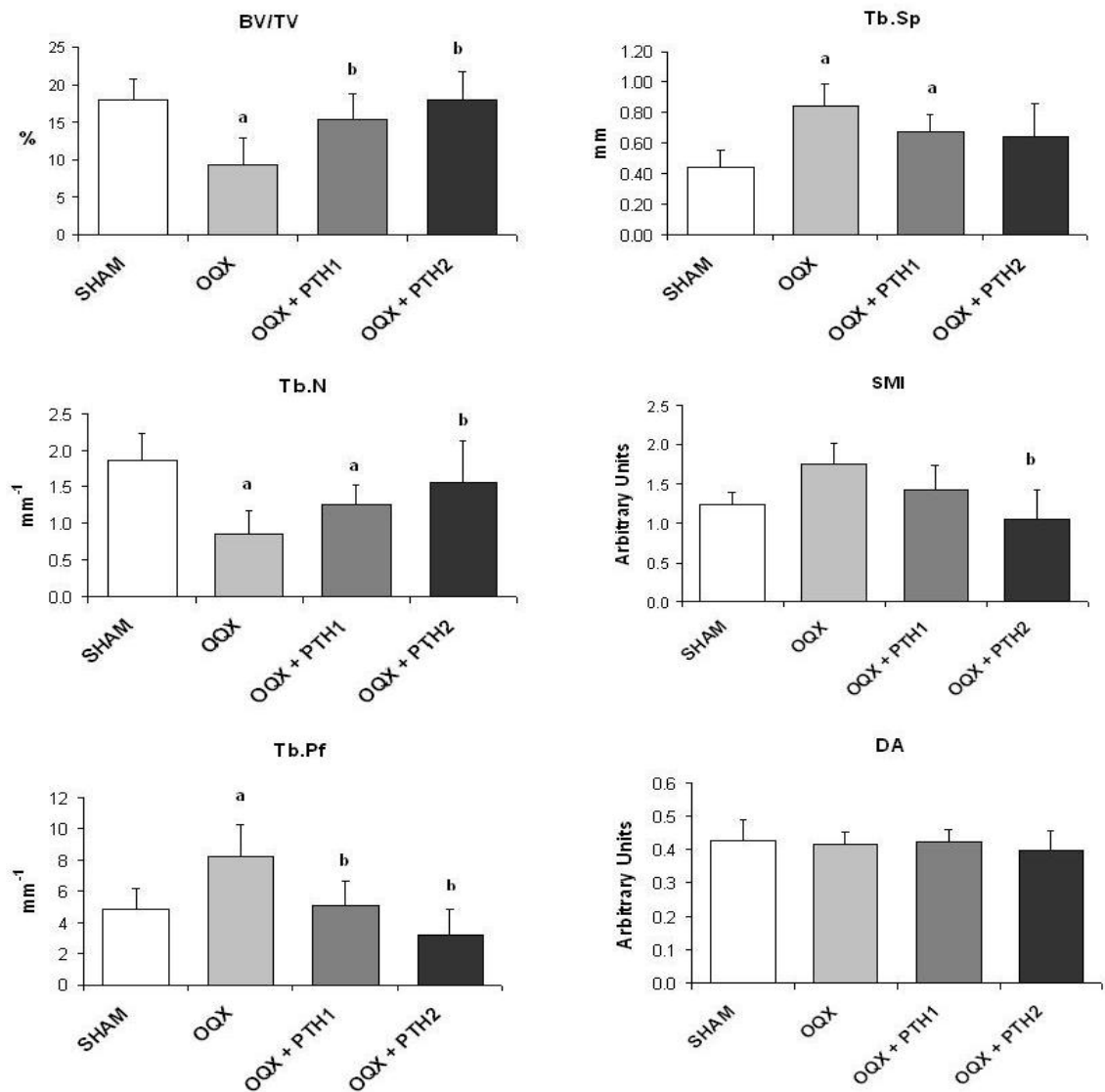
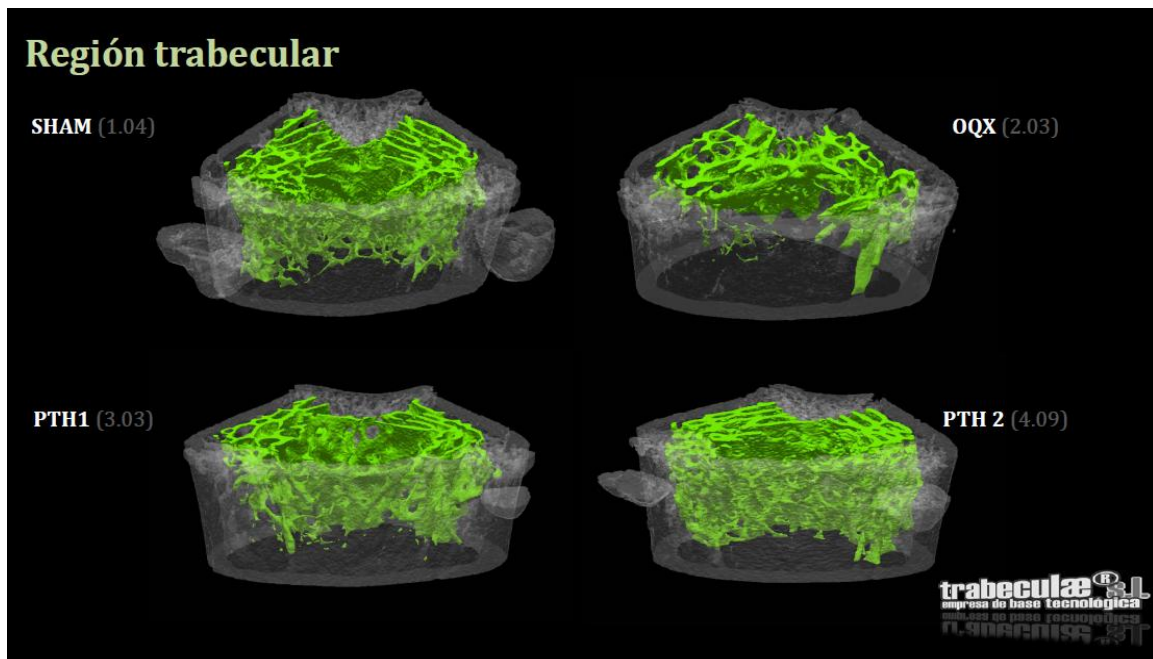
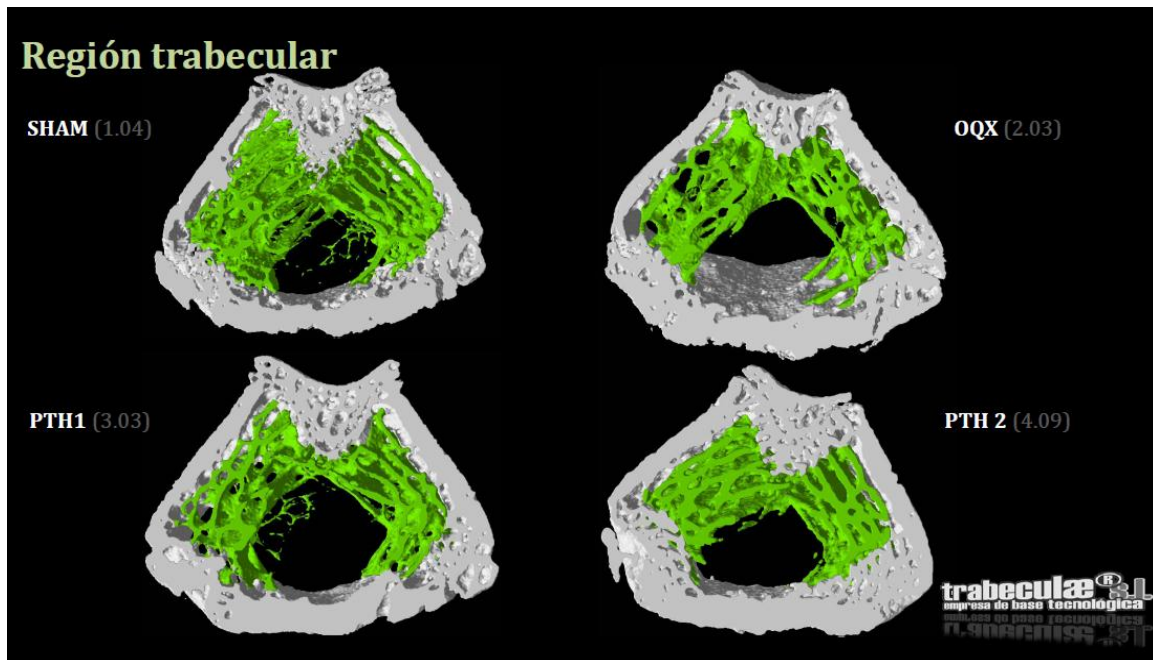


Figura 54. Análisis de la microestructura trabecular del fémur. Se identificaron el cociente volumen óseo/volumen total (BV/TV), el número de trabéculas (Tb.N), la separación trabecular (TbS), el factor de patrón trabecular (Tb.Pf), el índice de estructura del modelo (SMI) y el grado de anisotropía (DA). Significación estadística $p < 0.05$: (a) vs. SHAM; (b) vs. OQX.

A continuación mostramos los modelos tridimensionales obtenidos mediante μ CT (Figs. 55, 56 y 57) de las secciones de hueso trabecular. En las imágenes se aprecian visualmente los cambios entre los distintos

grupos, la clara pérdida de densidad trabecular en el grupo OQX no tratado y la recuperación en los grupos tratados con PTH, siendo más evidente en el grupo que recibió la dosis alta.



Figuras 55 (corte sagital) y 56 (sección AP). Imágenes representativas de la microarquitectura ósea trabecular del fémur en 3D obtenidas mediante μ CT. Los muestras se obtuvieron de los distintos grupos formados por ratas a las que se realizó una operación simulada (SHAM), ratas castradas (orquidectomía: ORX) y ratas castradas tratadas durante 3 meses con PTH 10 μ g/Kg/día (ORX+PTH1) y PTH 50 μ g/Kg/día (ORX+PTH2)

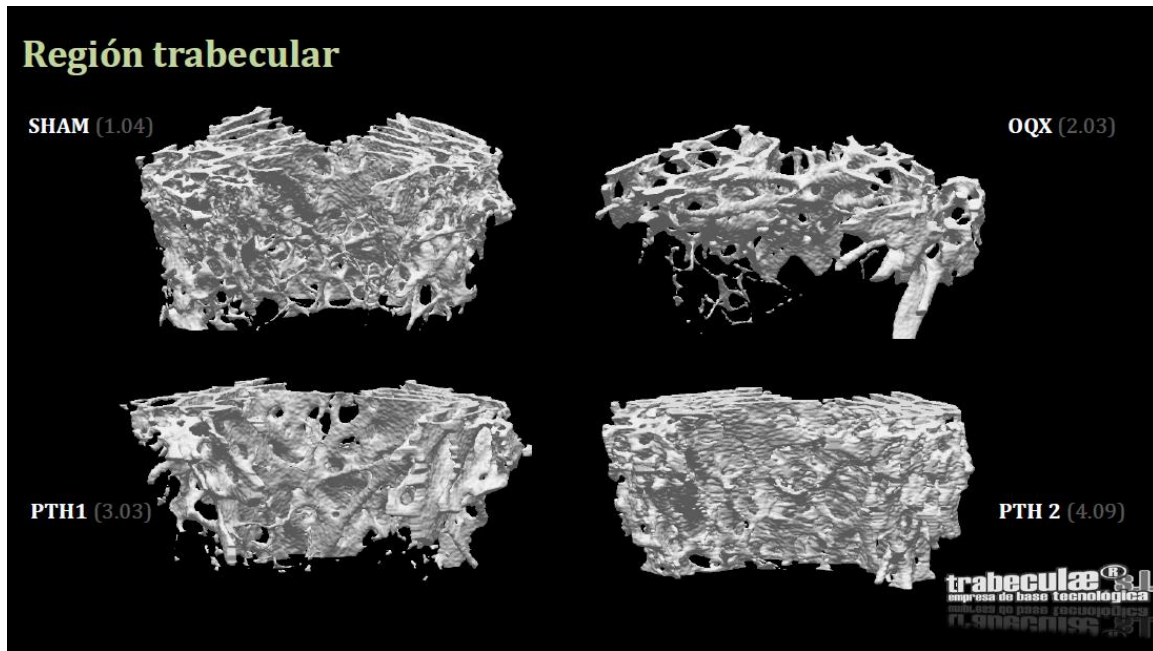


Figura 57 (extracción sección trabecular, proyección AP). Imágenes representativas de la microarquitectura ósea trabecular del fémur en 3D obtenidas mediante μ CT. Las muestras se obtuvieron de los distintos grupos formados por ratas a las que se realizó una operación simulada (SHAM), ratas operadas (OQX) y ratas operadas tratadas durante 3 meses con PTH 10 μ g/Kg/día (OQX+PTH1) y PTH 50 μ g/Kg/día (OQX+PTH2).

4.2.2. Microarquitectura ósea cortical

El grupo de ratas OQX presentó una disminución significativa de la medida del momento polar de inercia (MMI) comparado con el grupo control, (SHAM). Esta variable se recuperó tras el tratamiento con las dos dosis de PTH (1-84). Por el contrario, la or-

quidectomía no produjo ningún cambio en el área transversal cortical en comparación con las ratas del grupo control, pero el tratamiento con PTH (1-84) generó un incremento significativo de este parámetro. (Tabla 8 y Fig. 58). El resto de las variables no mostró diferencias significativas entre los grupos.

Grupo	test	B.Ar (mm^2)	MMI polar (mm^4)	Cs Th (mm)	C Th (mm)	Po %
A: SHAM	Media	7,50	34,60	0,45	0,49	0,24
	DE	0,85	4,80	0,09	0,09	0,20
B: OQX	Media	7,31	29,06	0,52	0,56	0,06
	DE	0,25	2,82	0,02	0,02	0,07
C: OQX+PTH1	Media	8,04	35,06	0,55	0,58	0,03
	DE	0,57	2,82	0,02	0,01	0,03
D: OQX+PTH2	Media	8,21	33,63	0,56	0,57	0,09
	DE	0,53	2,52	0,08	0,10	0,12
	p	<0,05 C,D vs B	<0,05 A, C, D vs B	ns	ns	ns

Tabla 8. Resultados media y DE de los parámetros microestructurales de las secciones de hueso cortical

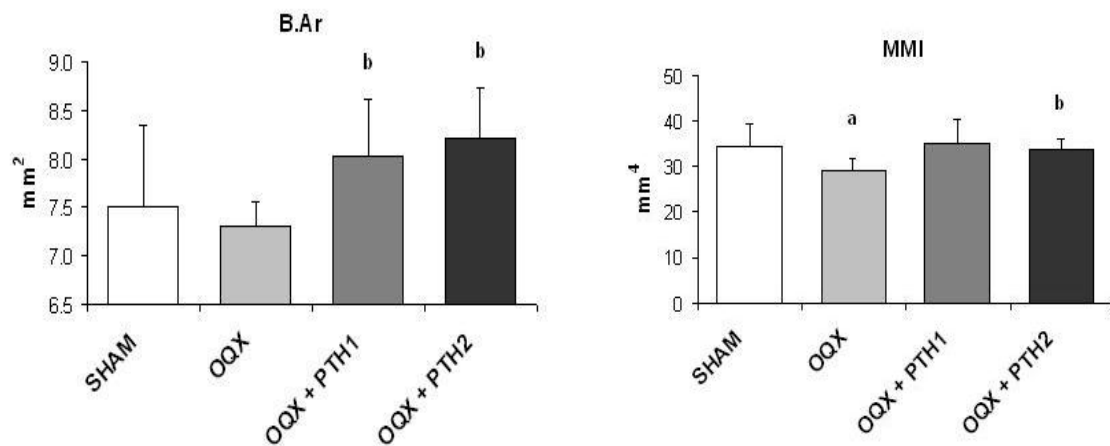


Figura 58. Análisis de la microarquitectura cortical. Media del área transversal cortical (B.Ar) y media del momento polar de inercia (MMI). Las ratas de 6 meses de edad fueron distribuidas en 4 grupos: Cirugía simulada (SHAM), ratas operadas no tratadas (OQX), ratas operadas tratadas durante 3 meses con PTH (1-84) 10 $\mu\text{g/Kg/día}$ (OQX+PTH1) y PTH (1-84) 50 $\mu\text{g/Kg/día}$ (OQX+PTH2), comenzando 3 meses después de la cirugía. Los datos están expresados como media+ DE en grupos de 10 animales. Significación estadística $p < 0.05$: (a) vs. SHAM; (b) vs. OQX

A continuación mostramos los modelos tridimensionales obtenidos mediante μCT (Fig. 59) de las secciones de hueso cortical. A diferencia de los que ocurría en el hueso trabecular, en este caso es más difícil apre-

ciar visualmente las diferencias producidas en la cortical ósea, tanto por la privación androgénica en las ratas OQX, como por el tratamiento.

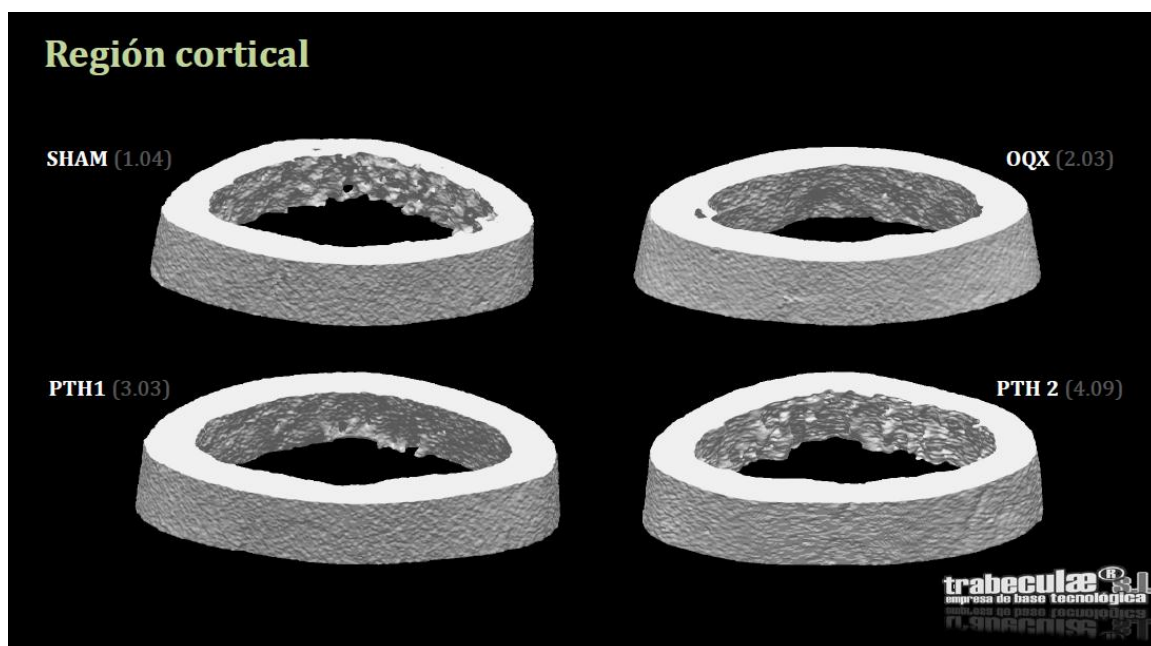


Figura 59. Imágenes representativas de la microarquitectura ósea cortical del fémur en 3D obtenidas mediante μCT . Las muestras se obtuvieron de los distintos grupos formados por ratas a las que se realizó una operación simulada (SHAM), ratas operadas (OQX) y ratas OQX tratada con PTH 10 $\mu\text{g/Kg/día}$ (OQX+PTH1) y PTH 50 $\mu\text{g/Kg/día}$ (OQX+PTH2).

4.2.3. Propiedades biomecánicas del hueso (ensayos de flexión)

Aplicamos el test de flexión en tres puntos a las muestras de hueso femoral acuerdo con la metodología anteriormente descrita. La OQX produjo un descenso significativo en la fuerza máxima (Fult), rigidez (S) y trabajo de rotura (U), sin variaciones en el desplazamiento máximo (δ ult). El tratamiento con ambas dosis de PTH (1-84) revirtió el efecto sobre las variables anteriormente identificadas, siendo los valores de rigidez obtenidos significativamente superiores a los animales

que recibieron la dosis alta de PTH (1-84). En cuanto a las propiedades intrínsecas, no se observaron diferencias significativas del grupo OQX con respecto al grupo control (SHAM). La dosis de 50 μ g/Kg de PTH (1-84) produjo un aumento significativo del módulo de Young aparente (E) y de la tensión máxima (σ ult) con respecto a todos los grupos estudiados. (Tabla 9). Estos resultados son concordantes con los valores obtenidos para la DMO y los parámetros de microarquitectura, demostrando que la administración de la dosis más alta de PTH (1-84) genera cambios más objetivables de la calidad ósea.

Tabla 9. Resultados de las propiedades biomecánicas extrínsecas e intrínsecas por grupos

Grupo	test	Fult (N)	δ ult (mm)	S (N/mm)	U (mJ)
A: SHAM	Media	214,33	0,72	306,80	101,80
	DE	34,84	0,18	46,50	41,03
B: OQX	Media	180,87	0,69	265,44	84,57
	DE	24,57	0,15	35,62	29,75
C: OQX+PTH1	Media	216,57	0,71	302,36	104,96
	DE	32,92	0,09	36,79	29,31
D: OQX+PTH2	Media	220,52	0,65	340,51	88,77
	DE	34,58	0,12	29,10	29,04
	p	<0,05 A, C, D vs B		<0,05 D vs A, B y C	

Grupo	test	σ ult (MPa)	ϵ ult (n.a.)	E (MPa)	u (MPa)
A: SHAM	Media	203,28	0,07	2949,84	9,68
	DE	30,85	0,02	567,79	3,80
B: OQX	Media	185,66	0,06	2916,05	8,78
	DE	23,07	0,01	557,85	3,44
C: OQX+PTH1	Media	207,16	0,07	2974,82	9,37
	DE	27,75	0,01	671,40	2,39
D: OQX+PTH2	Media	216,01	0,06	3394,28	8,60
	DE	28,81	0,01	518,73	2,76
	p	ns	ns	<0,05 D vs A, B y C	

4.2.4. Cambios en los marcadores de remodelado óseo

Nueve meses tras la orquidectomía, las ratas que no habían sido tratadas con PTH presentaron los mismos niveles de BGP que las ratas control (SHAM). El tratamiento con las dos dosis de PTH ocasionó una elevación significativa de los valores de BGP (OQX+PTH1, $p<0.05$; OQX+PTH2, $p<0.01$) comparándolos con el grupo OQX. Sin embargo, no existió diferencia significativa entre el valor medio de

BGP obtenido en el grupo OQX+PTH1 y el obtenido para el grupo SHAM, aunque sí se demostraron diferencias significativas entre el grupo SHAM y el grupo tratado con la dosis alta de PTH (1-84).

El índice de resorción CTX/TRAP 5b aumentó significativamente en ratas OQX no tratadas, y se mantuvieron los mismos valores tanto en el grupo tratado con la dosis alta (OQX+PTH2) como con la dosis baja (OQX+PTH1). (OQX, $p<0.05$; OQX+PTH1, $p<0.05$; OQX+PTH2, $p<0.05$, todos ellos vs SHAM) (Figura 60).

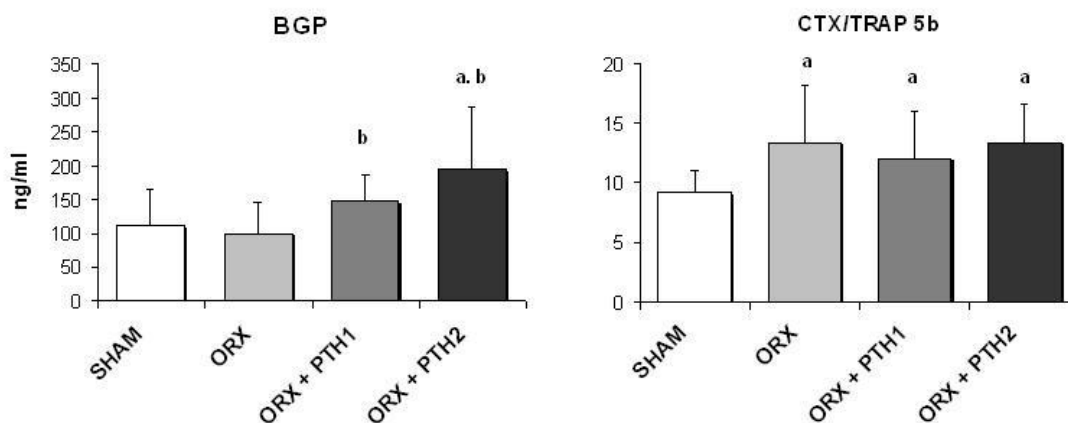


Figura 60. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. (A) BGP (ng/ml) y (B) índice de resorción CTX/TRAP5b, (ng/ml)/ (U/L). Las ratas de 6 meses de edad fueron distribuidas en 4 grupos: Cirugía simulada (SHAM), ratas operadas no tratadas (OQX), ratas operadas tratadas durante 3 meses con PTH (1-84) 10 mg/Kg/día (OQX+PTH1) y PTH (1-84) 50 mg/Kg/día (OQX+PTH2), comenzando 3 meses después de la cirugía. Los datos están expresados como media+DE en grupos de 10 animales. Significación estadística $p<0.05$: (a) vs. SHAM; (b) vs. OQX

DISCUSIÓN



5. Discusión

La OP del varón emerge como un tema de relevancia entre las enfermedades del metabolismo óseo, existiendo en los últimos tiempos un número creciente de publicaciones en este campo, tanto a nivel de experimentación preclínica como clínica. Durante la pasada década, la mayoría de los estudios preclínicos en animales de experimentación utilizaron ratas. Su esqueleto ha demostrado ser útil para entender los cambios en el remodelado óseo, y en general, el modelo sirve para establecer puntos de partida para el estudio de los agentes farmacológicos en humanos [101]. El modelo experimental de OP inducida por gonadectomía en roedores, ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los agentes antiosteoporóticos, tanto en animales macho como hembras. Además de tener muchas ventajas técnicas para poder llevarlo a cabo, es importante reseñar que la obtención de material óseo para la realización de test biomecánicos y estudios de microarquitectura mediante μ CT, ya que es posible estudiar los efectos de los fármacos a un nivel más profundo, obviando los conflictos éticos o metodológicos que surgen en los estudios que se realizan en humanos [102].

A la hora de documentar la discusión de los resultados del estudio nos planteamos dos tareas: comparar nuestros re-

sultados con otros obtenidos en estudios similares e identificar las características fundamentales del mecanismo de acción del fármaco, que puedan ayudar para el diseño de estudios posteriores. Al revisar la literatura publicada que hace referencia a estudios preclínicos realizados en roedores para valorar los efectos de los osteoformadores, observamos que existe una falta de uniformidad en los diseños, habiéndose empleado animales de distintas razas, sexos y edades; además de diferentes fragmentos de PTH con distinta potencia y dosis y duraciones de los tratamientos diferentes, lo que genera una gran heterogeneidad y hace difícil comparar estudios. A pesar de ello, hemos analizado las diferencias y similitudes de los estudios similares recientemente publicados con nuestro trabajo, pasando a continuación a resumirlas.

Dado que la mayoría de los estudios diseñados en modelos animales de OP se han realizado en hembras ovariectomizadas y que nosotros planeamos realizar un estudio exclusivamente en machos, resulta interesante comparar los efectos de la orquidectomía (OQX) y la ovariectomía (OVX) en el hueso de los animales. Esta última ocasiona una disminución del área trabecular en la metáfisis y un aumento del número de osteoclastos, sugiriendo que los estrógenos protegen predominantemente este tipo de hueso, inhibiendo el reclutamiento de los osteoclastos. La OQX tam-

bién ocasiona una disminución del área trabecular en la metáfisis con incremento del número de osteoclastos, pero adicionalmente se reduce la formación perióstica en el hueso cortical. Por tanto, la aparición de efectos negativos sobre el hueso cortical es la principal diferencia en la fisiopatogénesis de la osteopenia inducida por la gonadectomía en machos y la que ocurre en las hembras por la misma causa [103].

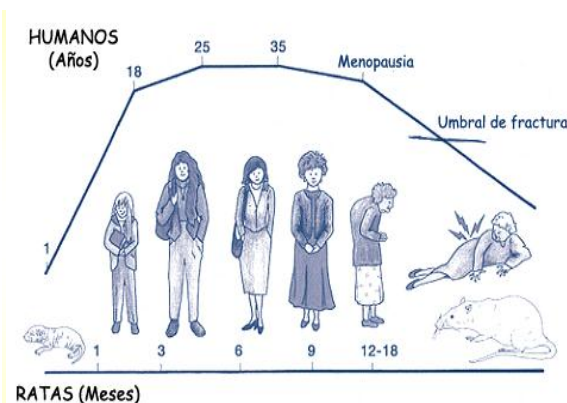


Figura 61: Equivalencias de edad entre ratas y humanos

Por lo que respecta a la edad de los animales en el momento de la castración, la mayoría de los estudios han empleado animales jóvenes (menores de 6 meses), con tasas de remodelado elevadas. Sin embargo, el modelo que emplea ratas macho adultas, realizando la OQX a los 6 meses de vida (Figura 61), representa condiciones más cercanas a la pérdida ósea que ocurre en humanos, por lo que sería más adecuado para evaluar el efecto de los fármacos [104], y es por tanto el que elegimos para esta tesis.

De manera similar a otros autores, pudimos comprobar que la privación androgénica inducida por OQX en ratas Wistar adultas, ocasiona osteopenia a las pocas semanas de la cirugía, por lo que establecimos la duración máxima del tiempo sin tratamiento desde la gonadectomía en 3 meses. Igualmente, se ha descrito que la OQX produce cambios en la composición corporal de distintas razas de roedores, (incluyéndose ratas Wistar), a expensas principalmente de la pérdida de masa ósea, cambios en la distribución de la grasa y disminución de la masa muscular [105, 106]. Nosotros observamos una disminución de un 13% del peso en nuestras ratas OQX frente a los controles a los 12 meses, que se recuperó parcialmente pero de forma significativa en el grupo de animales tratados durante 3 meses con 10 µg/Kg/día de PTH (1-84). Aunque el estudio no estaba diseñado para saber en qué proporción contribuía la pérdida de masa ósea a la pérdida de peso que identificamos en nuestros animales, la recuperación parcial del mismo con la administración de PTH nos hace pensar la destrucción del tejido óseo contribuye en gran medida a la pérdida ponderal hallada.

En relación a la potencia y efectos de los distintos péptidos osteoformadores, la mayoría de los estudios realizados han empleado teriparatida, que ha demostrado aumentar la masa ósea en roedores jóve-

nes de ambos sexos tras la gonadectomía [107,108]. Tezval y cols. [109] estudiaron el efecto de 4 µg/Kg de teriparatida administrados diariamente durante 5 semanas en ratones Sprague–Dawley adultos a las 12 semanas de la OQX, y Montero y cols. [103] trataron ratas macho Wistar adultas con 4 µg/Kg de teriparatida/día durante 10 semanas, iniciando el tratamiento a las 24 semanas de la castración. En ambos casos, teriparatida fue capaz de mejorar la pérdida de masa ósea inducida por el hipogonadismo en la región trocantérica. Por otro lado, en un modelo de rata OVX, tras 12 meses de tratamiento con PTH (1-84), se mostró un incremento de la DMO de la vértebra lumbar de más de 4 veces frente a la que presentaba el animal osteoporótico [110]. Asimismo, se han realizado estudios que comparan el efecto de los dos péptidos, teriparatida y PTH (1-84) en ratas OVX, sin encontrarse diferencias en cuanto al efecto biológico demostrado por ambos fármacos [111-113]. Este hecho nos puede llevar a pensar que los efectos de PTH (1-84) y teriparatida son comparables en la OP inducida en hembras OVX, sin embargo en nuestra revisión bibliográfica no encontramos estudios publicados que describiesen el efecto de la administración de la hormona paratiroidea completa (PTH 1-84) en situaciones de depleción androgénica, y ese fue el motivo de plantear esta hipótesis para nuestro trabajo.

El último elemento a decidir en el diseño del estudio fue seleccionar la dosis adecuada de PTH (1-84) para el experimento. Para ello tuvimos en cuenta que la dosis de PTH (1-84) fuera equipotente a las dosis administradas en los estudios de teriparatida. Decidimos igualmente utilizar una segunda dosis para poder evaluar la existencia de un efecto dosis-respuesta. Con estas consideraciones, el laboratorio fabricante del medicamento recomendó utilizar las dosis de 10 y 50 µg/Kg/día, que equivalen en base molar a una dosis de entre 5 y 25 µg/Kg/día de teriparatida. Como hemos comentado, la dosis más baja (10 µg/Kg/día), se corresponde con la dosis más frecuentemente utilizada en los estudios de teriparatida (4 µg/Kg/día). Esta dosis se ha considerado segura al no generar cambios patológicos proliferativos en el hueso al utilizarse durante 2 años en ratas Fisher 344 macho de 9-11 meses [114]. Asimismo, la dosis de 10 µg/Kg de PTH (1-84) genera una exposición sistémica a PTH 4,6 veces superior de la que se obtiene con la dosis clínica utilizada en pacientes (100 µg), lo que proporciona un amplio margen de seguridad en cuanto a la selección de la dosis para estudios en humanos [115]. Por los motivos ya comentados, también empleamos una dosis más alta en nuestro estudio (50 µg/Kg/día). En cuanto a la duración total del tratamiento, en nuestro modelo se limitó a 12 semanas, siendo ésta la

duración equivalente del tratamiento con péptidos osteoformadores en humanos (18-24 meses), ya que es conocido que la aparición de cambios proliferativos descritos con el uso de péptidos de PTH en hueso se relacionan con la dosis empleada, pero también con la duración del tratamiento.

En cuanto a los hallazgos más relevantes de la acción de PTH (1-84) en este modelo de osteopenia en ratas, es interesante reseñar que detectamos un 13% de pérdida de la DMO medida por DXA en hueso femoral en el animal OQX respecto del control SHAM a las 24 semanas de la cirugía, cifra similar a la descrita en modelos de osteoporosis post-OVX [105]. Asimismo, pudimos comprobar que los animales OQX presentaron una disminución del BV/TV, a expensas de la disminución del número de trabéculas y el aumento de separación entre ellas en la porción proximal del fémur. Este resultado es similar al encontrado por otros autores en estudios que utilizan el mismo modelo [104], indicando que la falta de testosterona genera una disminución de la masa ósea, asociada a una pérdida de la estructura del hueso esponjoso que se caracteriza por la desaparición porcentual de trabéculas y el adelgazamiento de las mismas. En cuanto a la microarquitectura del hueso cortical, la OQX no generó cambios en el área cortical transversal media, pero sí en el momento polar de inercia medio, frente al grupo con-

trol. Se ha descrito que los efectos de la gonadectomía sobre el compartimento cortical son más tardíos y menos profundos que sobre el hueso trabecular, lo que comprobamos en nuestro modelo.

Utilizamos técnicas de DXA y QCT para realizar el análisis de los cambios en masa y microarquitectura ósea. También realizamos el análisis biomecánico para valorar la respuesta a la tensión y a la carga, para lo que nos focalizamos principalmente en el fémur proximal, que contiene cantidades sustanciales de hueso trabecular y cortical. En cuanto a los cambios en la masa ósea, la dosis baja de PTH (1-84) generó cambios positivos en la recuperación de la DMO en vértebra y fémur distal, siendo la dosis alta la que consiguió restablecer la pérdida de DMO ocasionada por la OQX, de manera similar a lo que se ha descrito en el caso de las hembras OVX tratadas con PTH (1-84) y con teriparatida.

Los valores de las variables microestructurales fueron concordantes con los cambios obtenidos en la densitometría ósea. La dosis alta de PTH (1-84) revirtió totalmente los cambios ocurridos por la OQX, observándose valores similares en las variables BV/TV, Tb.Sp y Tb.N a los que se obtuvieron de las muestras de las ratas del grupo. La dosis baja de PTH (1-84) restableció el valor de BV/TV, con una tendencia positiva en los parámetros Tb.Sp

y Tb.N., aunque no estadísticamente significativa. Audran y cols. [116], estudiaron la relación entre los valores microestructurales obtenidos de la región proximal de la tibia de ratas Wistar OQX y los compararon con los valores histomorfométricos obtenidos mediante biopsia ósea transilíaca en varones con osteopenia lumbar inducida por glucocorticoides y osteoporosis primaria. Sus resultados afirman que la microarquitectura ósea trabecular es un determinante mayor independiente de la fractura vertebral en varones con osteoporosis, por lo que la reversibilidad del deterioro de los valores histomorfométricos que hemos demostrado en nuestro estudio al utilizar la dosis alta de PTH (1-84), nos indica que el medicamento puede ser útil en el tratamiento de la osteoporosis del varón, aunque por supuesto serían necesarios estudios en humanos para poder confirmar esta hipótesis.

Las propiedades estructurales del hueso cortical más comúnmente empleadas como variables subrogadas para determinar su competencia mecánica, incluyen el grosor cortical, el área cortical transversal y el momento de inercia. En nuestro estudio, el área cortical transversal media fue superior con las dos dosis de PTH (1-84) frente al grupo SHAM, lo que se puede explicar por mecanismo de acción de los péptidos anabólicos sobre el hueso cortical, como ya se ha descrito anteriormente. En

cuanto al momento polar de inercia, que es un parámetro microestructural que predice la capacidad del hueso de resistir a la torsión, fue restablecido en nuestro estudio con ambas dosis de PTH (1-84) a los valores que presentaron los animales del grupo SHAM, lo que indica que el engrosamiento cortical generado por PTH (1-84) puede contribuir a mejorar su resistencia. Por último, los resultados obtenidos en el test biomecánico fueron consistentes con el resto de resultados anteriormente comentados, esto es que el tratamiento con ambas dosis de PTH (1-84) revirtió los efectos deletéreos producidos por la OQX en varias de las propiedades extrínsecas (fuerza máxima, rigidez y trabajo de rotura) de los fémures. A pesar de que la OQX no produjo diferencias en las propiedades intrínsecas frente al grupo control sano, la dosis alta de PTH (1-84) mejoró los parámetros módulo de Young aparente y tensión máxima, comparado con todos los demás grupos. El primero corresponde al comportamiento elástico del tejido estudiado y al igual que el segundo, aumenta al aumentar la resistencia ósea frente a la carga. En nuestro estudio pudimos demostrar que el tratamiento con PTH (1-84) mejora las propiedades biomecánicas que explican el comportamiento del hueso frente a la carga y tensión, a diferencia del estudio realizado por Montero y cols. anteriormente mencionado [103], en el que se realizaron test

biomecánicos de torsión en el fémur de ratas OQX tratadas durante 72 días con una dosis de 4 µg/Kg/día de teriparatida, sin hallarse cambios en ninguno de los parámetros biomecánicos frente al grupo OQX y al grupo control. Las diferencias entre los resultados del estudio de nuestros colegas y los de este trabajo, podrían estar relacionadas con el empleo de una metodología diferente para la realización de las pruebas biomecánicas, que posiblemente en nuestro caso (al aplicar test de flexión), ha resultado ser más sensible en la determinación de los cambios en la resistencia ósea inducidos por el tratamiento.

Para medir la actividad osteoclástica elegimos como marcador de resorción ósea el cociente CTX/TRAP 5b, en lugar de cada uno de dichos marcadores por separado. A continuación explicamos la justificación de uso de este cociente: en un estudio de Rissanen y cols. realizado en 2008 [117], se demuestra que la TRAP 5b liberada al medio es un buen indicador del número de osteoclastos, y los niveles de CTX lo son de la actividad resortiva de dichos osteoclastos. Cuando aumenta mucho la resorción, la actividad de los osteoclastos está muy incrementada, pero al ir quedando menos hueso, el número absoluto de osteoclastos desciende. La manera más real de calcular la actividad osteoclástica se obtiene dividiendo la actividad de los osteoclastos (reflejada por el marcador CTX)

por su número total (identificado mediante el marcador TRAP 5b). De modo que el marcador ideal para medir la resorción ósea en caso de pérdidas óseas intensas será el cociente CTX/TRAP 5b, y por ello se ha expresado así el grado de resorción ósea en esta tesis. En el presente trabajo, encontramos una elevación el cociente CTX/TRAP 5b en ratas OQX a los 3 meses de la cirugía; sin embargo, los valores de BGP no mostraron diferencias significativas en los animales OQX frente a los controles. La OQX produce un incremento general del remodelado óseo, como ha sido descrito por otros autores [118], que encontraron un aumento de la BGP sérica y de la desoxipiridinolina en determinaciones realizadas a las 2 semanas tras la OQX, manteniéndose elevadas durante 9 meses en ratas Fischer de 13 meses de edad. Nosotros encontramos un aumento el cociente CTX/TRAP 5b, pero no de la BGP. Esto puede deberse a que lo que han determinado otros autores es un aumento transitorio de este marcador, que ya no sería detectable 3 meses después de la cirugía, hecho que ha sido descrito por Vanderschueren et al., que observan en ratas Wistar de 6 meses de edad (similares a las nuestras), un incremento transitorio de los niveles séricos de TRAP 5b, 7 días tras la OQX, pero que vuelven a la normalidad 1 mes después [119]. Otros autores, encuentran también un aumento transitorio del remodelado óseo al mes de realizar la OQX, recupe-

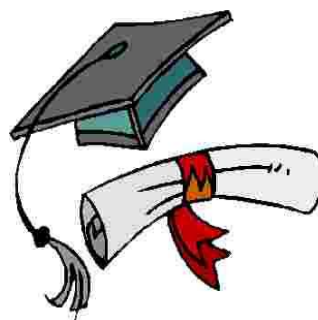
rando valores normales 4 meses después [120].

La dosis alta de PTH (1-84) demostró incrementos significativos de BGP por encima de los valores medios que presentaba el grupo SHAM, con lo que los cambios ocurridos en la masa ósea y en los parámetros histomorfométricos y biomecánicos podrían relacionarse con los efectos anabólicos del fármaco. El índice de resorción se mantuvo en niveles elevados en las ratas OQX, indicando la presencia de resorción ósea en este grupo, siendo estos valores estadísticamente significativos frente al grupo SHAM. Dichos valores elevados en el grupo OQX se mantuvieron sin diferencias en los grupos tratados con las dos dosis de PTH (1-84), lo que indica la existencia de un efecto pro-resortivo limitado del fármaco. En resumen, los datos obtenidos sobre los marcadores de formación y resorción ósea en relación al efecto de ambas dosis de PTH (1-84) son consistentes con los resultados publicados en la literatura revisada [68, 69, 70].

Aunque este estudio proporciona información novedosa sobre el efecto de PTH (1-84) en un modelo experimental en rata macho, existen limitaciones evidentes a la hora de extrapolar los resultados a los humanos. A pesar de ello, creemos que este modelo experimental nos permite establecer las bases farmacológicas del estu-

dio de los efectos de PTH (1-84) en la OP masculina, lo que resulta imprescindible antes de llevar a cabo estudios clínicos para valorar dichos efectos en pacientes varones. Dado que teriparatida está indicada en el tratamiento de la osteoporosis primaria del varón, quizás sería interesante diseñar estudios *head-to-head* que valoren comparativamente la eficacia y seguridad de PTH (1-84) frente a teriparatida en esta población de pacientes.

CONCLUSIONES



6. Conclusiones

Nº 1: La privación androgénica generó una pérdida de peso significativa, disminución relevante de masa ósea femoral y lumbar, desestructuración del hueso trabecular con alteración de las propiedades biomecánicas óseas, asociados a un aumento significativo de la resorción ósea en nuestras ratas Wistar orquidectomizadas.

Nº2: PTH (1-84) demostró efectos positivos sobre los valores de masa ósea, parámetros microestructurales del hueso cortical y trabecular y variables biomecánicas. La dosis alta revirtió el efecto negativo sobre la masa y la calidad ósea que originó la privación androgénica, retornando los valores de DMO y variables histomorfométricas a cifras similares a las que presentaban los controles sanos. Además, sus efectos sobre algunas variables biomecánicas extrínsecas e intrínsecas y sobre los marcadores de formación ósea, superaron los valores que había mostrado el grupo control no osteopénico.

Nº3: PTH (1-84) demostró un efecto dosis respuesta en nuestro modelo, tal y como se ha descrito en estudios anteriores. La dosis baja empleada en nuestro estudio (equipotente a la utilizada por teriparatida en estudios animales) mejoró las variables de calidad y masa ósea, en comparación con las que mostraban los animales orquidectomizados.

Nº4: Este es el primer estudio en el que se muestra el efecto de PTH (1-84) en un modelo experimental de OP del varón. Los resultados de los valores de los marcadores de remodelado óseo, DMO, microarquitectura trabecular y cortical y tests biomecánicos, son concordantes con el mecanismo de acción del fármaco.

Nº5: Los resultados obtenidos en este estudio son comparables con los resultados obtenidos por teriparatida en modelos similares, y son un punto de partida para identificar la dosis diana a emplear en estudios clínicos; sin embargo es necesario realizar estudios en pacientes que confirmen los beneficios de PTH (1-84) en la OP del varón .

8. Bibliografía

1. Forbes GB. Body composition: influence of nutrition, disease, growth and aging. En: Shils ME, Olson JA and Shike M (Eds). Modern nutrition in health and disease. 8th Edition. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994
2. Baron R. Principios generales de la biología ósea. Capítulo 1. En: Favus MJ, Editor. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Barcelona: Medical Trends, 2005:1-9.
3. Zaleske DJ. Embriología y formación del hueso. En: Netter Ortopedia. Barcelona: Elsevier Masson, 2007; 2-21.
4. Álvarez Llanas A y Nogales López J. En: manual del residente de C.O.T. Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
<http://www.manualresidentecot.es/es/bloque-i-estructura-funcion-respuestas-reparadoras/1-tejido-oseo>. Accedido el 15/01/2012.
5. Rossert J, Terraz C, Dupont S. Regulation of type I collagen genes expression. Nephrol Dial Transplant 2000; 15 (suppl 6):66-68.
6. Tohmé JF, Seibel MJ, Silverberg SJ. Biochemical markers of bone metabolism. Rheumatol 1991; 50:133-41.
7. De la Piedra C. Aplicaciones clínicas de los marcadores bioquímicos óseos en la osteoporosis. Capítulo 6. En: Escobar-Jiménez F y Hawkins F, Editores. Alteraciones del metabolismo mineral en endocrinología. Madrid: Grupo Aula Médica, 2002:51-61.
8. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. Clin Chem 1999; 45:1359-1368.
9. Fleisch H. Bone structure and function: an overview. Lecture presented in Lyon, January 21-24, 2002. International Osteoporosis Foundation
10. Nordin BE. Calcium and osteoporosis. Nutrition 1997;13:664-86.
11. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 2000; 21:115-137.

12. Postel-Vinay MC, Kelly PA. Growth hormone receptor signalling. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10:323-336.
13. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241:84-86.
14. Abu EO, Horner A, Kusec V. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3493-3497.
15. Baron R. Principios generales de la biología ósea. Capítulo 1. En: Favus MJ, Editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Barcelona: Medical Trends, 2005:1-9.
16. Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 1996; 137:4058-4060.
17. Kanis JA. *Osteoporosis*. Oxford: Blackwell Science, 1994.
18. Fleisch H. Structure and function of bone. An overview. Lecture presented in Lyon, January 29-31, 1996. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease.
19. Nogués X, Editor. *Formadores de hueso*. Barcelona: Scientific Communication Management, 2005.
20. Canalis E. Systemic and local factors and the maintenance of bone quality. *Calcif Tissue Int* 1993;53 Suppl 1:S90-S92.
21. Cosman F, Lindsay R. Therapeutic potential of parathyroid hormone. *Curr Osteoporos Rep*. 2004; 2:5-11.
22. Bringhurst FR. PTH receptors and apoptosis in osteocytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002; 2:245-51.
23. Van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ. Vitamin D control of osteoblast functions and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001; 11:199-226.
24. Zaidi M, Moonga BS, Abe E. Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *J Clin Invest*. 2002; 110:1769-1771.
25. Linderg MK, Erlandsson M, Alatalo SL. Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol*. 2001; 17:425-33.

26. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen and androgens receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001; 104:719-730.
27. Vanderschueren D, Vandput L, Boonen S. Androgens and bone. *Endocr Rev*. 2004; 2:389-425.
28. Vanderschueren D, Venken K, Ophoff J. Clinical Review: Sex steroids and the periosteum. Reconsidering the roles of androgens and estrogens in periosteal expansion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:378-82.
29. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*. 2001; 79:245-53.
30. Muñoz-Torres M, Higuera López-Frías M, Fernández D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *Med Clin (Barc)* 2004;122:75-7
31. Paszty C, Turner CH, Robinson MK. Sclerostin: a gen from the genome leads to bone-building antibodies. *J Bone Miner Res* 2010; 45:1897-1904
32. Reyes García R, Rozas Moreno P, Muñoz-Torres M. Regulación del proceso de remodelado óseo. *REEMO* 2008;17:10-4
33. Gundberg CM. Biology, Physiology and Clinical Chemistry of Osteocalcin. *J Clin Ligand Assay* 1998; 21: 128-138.
34. Domínguez C, Sosa M, Traba ML. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 1998; 8: 147-151.
35. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: A novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1337-1345.
36. Fledelius C, Johnson AH, Cloos PAC. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. *J Biol Chem* 1997; 272: 9755-9763.
37. Riancho JA y González Macías J. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Capítulo 7. En: Jarpyo Editores, S.A. 2004. ISBN: 84-88992-91-2
38. Cummings, SR, Black, D. Bone mass measurements and risk of fracture in Caucasian women: A review of findings from prospective studies. *Am J Med* 1995; 98 (Suppl 2A):24S.

39. Cummings SR, Steven R. Cummings MD. Risk factors for hip fracture in white women. *N Engl J Med* 1995; 332:767-73.
40. Pacifici, R, Rupich, R, Griffin, M. Dual energy radiography versus quantitative computer tomography for the diagnosis of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:705.
41. Khaw, KT, Reeve, J, Luben, R. Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. *Lancet* 2004; 363:197.
42. Hodson, J, Marsh, J. Quantitative ultrasound and risk factor enquiry as predictors of postmenopausal osteoporosis: comparative study in primary care. *BMJ* 2003; 326:1250.
43. Watts, NB. Bone quality: getting closer to a definition. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1148.
44. Bouxien ML, Boyd S, Christiansen BA. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25:1468-1482.
45. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987; 2:595-610.
46. Rincon E, Ros A, Claramunt R. Revista Tecnol@ y desarrollo, Junio 2004. Escuela Politécnica Superior. Univ Alfonso X el Sabio. http://www.uax.es/publicaciones/archivos/TECMAD03_002.pdf
47. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 1997; 20:315-328.
48. Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comp Meth Biomech Eng* 1997;1:15-23.
49. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14:595-608.
50. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285:785-795
51. International Osteoporosis Foundation. Osteoporosis in the European Community: a call to action. An audit of policy development since 1998, 2001.
52. Delmas PD, Fraser M. European Union challenges member states to fight the 'silent epidemic' of osteoporosis. *Eurohealth* 1998;4: 1-4.

53. Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 1992;2:285-9.
54. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. *Proc Nutr Soc* 2007; 66:158-165.
55. Stewart TL, Roschger P, Misof BM et al. Association of COLIA1 Sp1 alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralization in vivo. *Calcif Tissue Int* 2005; 77:113-118.
56. Francis RM. Male osteoporosis. *Rheumatology* 2000;39:1055-7.
57. Whitfield JF, Morley P, Willick GE. The parathyroid hormones: bone forming agents for the treatment of osteoporosis. *Medscape Women's Health*. 2000;5.
58. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357:905-916.
59. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 2007; 40:1434-1446.
60. Potts JT. PTH: past and present. *J Endocrinol*. 2005; 187:311–325.
61. Stilgren LS, Rettmer E, Eriksen EF. Skeletal changes in osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand mRNA levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Bone*. 2004; 35:256–265.
62. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 1997; 138:4607-4612.
63. Tam CS, Heersche JN, Murray TM. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 1982; 110:506-512.
64. Murray TM, Rao LG., Divieti P. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocrine Reviews* 2006; 1:78–113.
65. Jodar-Gimeno, E. Full length parathyroid hormone (1–84) in the treatment of osteoporosis in postmenopausal women *Clinical Interventions in Aging* 2007; 2:163–174

66. Hodsman AB, Fraher LJ, Watson PH. A randomized controlled trial to compare the efficacy of cyclical parathyroid hormone versus cyclical parathyroid hormone and sequential calcitonin to improve bone mass in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82:620–628.
67. Dempster DW, Cosman F, Parisien M. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev*, 1993; 14:690–709.
68. Hodsman AB, Fraher LJ, Ostbye T. An evaluation of several biochemical markers for bone formation and resorption in a protocol utilizing cyclical parathyroid hormone and calcitonin therapy for osteoporosis. *J Clin Invest*, 1993; 91:1138–1148.
69. Ficha técnica Preotact®. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000659/WC500041343.pdf. Accedido 1/03/2012.
70. Greenspan S, Bone HG, Ettinger MP. Effect of Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-84) on Vertebral Fracture and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *Ann Intern Med*. 2007; 146:326-339.
71. Keaveny TM, Hoffmann PF, Singh M. Femoral bone strength and its relation to cortical and trabecular changes after treatment with PTH, alendronate, and their combination as assessed by Finite Element Analysis of Quantitative CT Scans. *J Bone Miner Res*. 2008; 23:1974–1982.
72. van Londen GJ, Palermo L, Beck TJ. Hip structural analysis and volumetric QCT in postmenopausal women from the PaTH study: monotherapy or combination therapy with alendronate and PTH. *J Bone Miner Res*. 2008; ASBMR Annual Meeting Abstracts: M306.
73. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 2007; 40:1434-1446.
74. Kurland ES, Heller SL, Diamond B. The importance of bisphosphonate therapy in maintaining bone mass in men after therapy with teriparatide. *Osteoporos Int*. 2004; 15: 992–997
75. Orwoll ES, Scheele WH, Paul S. The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2003; 18:9-17.
76. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration (FDA) Draft. Washington Dc, April, 1994.

77. World Health Organization. Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis. WHO 1998, Geneva.
78. Bonjour JP, Ammann P, Rizzoli R. Importance of preclinical studies in the development of drugs for treatment of osteoporosis: a review related to the 1998 WHO guidelines. *Osteoporos Int* 1999; 9:379-393.
79. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16 (Suppl 2):S129-S138.
80. Yamazaki I, Yamaguchi H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J Bone Miner Res* 1989; 4:13-22.
81. Jerome CP, Turnr CH, Lees CJ. Decreased bone mass and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Calcif Tissue Int* 1997; 60:265-270.
82. Erben RG, Eberle J, Stahr K. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1085-1098.
83. Blouin S, Libouban H, Moreau MF. Orchidectomy models of osteoporosis. *Methods Mol Biol* 2008; 455:125-134.
84. Holroyd C, Cooper C, Dennison E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22:671-685.
85. Vestergaard P, Jorgensen NR, Mosekilde L. Effects of parathyroid hormone alone or in combination with antiresorptive therapy on bone mineral density and fracture risk--a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007; 18:45-57.
86. REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE núm. 252. Viernes, 21 octubre 2005; 34367
87. Gala Paniagua J, Díaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C et al. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Brit J Radiol* 1998; 71:754-758.
88. Feldkamp L. A., Davis L. C., Kress J. W. Practical cone beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am.* 1984; 53: 612-619.
89. Hildebrand T, Ruegsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 1997; 185:67-75.

90. Ulrich D, Van RB, Laib A. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 1999; 25:55-60.
91. Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1997; 1:15-23.
92. Harrigan TP, Mann RW. Characterisation of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *J Mater Sci* 1984; 19:761-767.
93. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M. Trabecular bone pattern factor, a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992; 13:327-330.
94. Turner CH. Biomechanics of bone: Determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis Int* 2002; 13:97-104.
95. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 1993; 14:595-608.
96. An YH, Draughn RA. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. CRC Press, Boca Raton, FL; 1999.
97. Shear and three-point bending test of animal bone. ANSI/ASAE S459. Approved Feb 1993; reaffirmed Mar 1998 by American National Standards Institute.
98. Jamsa T, Jaloara P, Peng Z. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 1998; 23:155-161.
99. Saffar KP, JamilPour N, Rajaai SM. How does the bone shaft geometry affect its bending properties? *Am J Appl Sci* 2009; 6:463-470.
100. Turner CH. Biomechanics of bone: Determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis Int* 2002; 13:97-104.
101. Hock JM. Anabolic actions of PTH in the skeletons of animals. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 2:33-47.
102. Hernandez, A. L. Ramos, K. R. Micheletti. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporosis Int*. DOI 10.1007/s00198-011-1539-8.
103. Montero M, Serfati D, Luna S. The effectiveness of intermittent rat parathyroid hormone (1-34) treatment on low bone mass due to oestrogen or androgen depletion in skeletally mature rats. *Aging Male* 2010; 13:59-73.

104. Blouin S, Libouban H, Moreau M. Orchidectomy models of osteoporosis. En: Osteoporosis: Methods in Molecular Biology, 2008; 455:125-134.
105. Borst SE, Conover CF. Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state. Life Sci. 2006 Jun 20;79(4):411-5.
106. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. J Orthop Res. 2011; 29:189-196.
107. Kurland ES, Cosman F, McMahon DJ. Parathyroid hormone as a therapy for idiopathic osteoporosis in men: effects on bone mineral density and bone markers. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:3069–3076.
108. Miyakoshi N. Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis. Curr Pharm Des. 2004; 10:2615-2627.
109. Tezval et al. Effect of parathyroid hormone on hypogonadism induced bone loss of proximal femur of orchiectomized rat. World J Urol, 2011 Feb 5 Epub ahead to print DOI 10.1007/s00345-011-0652-9.
110. Fox J, Miller MA, Newman MK. Daily treatment of aged ovariectomized rats with human parathyroid hormone (1-84) for 12 months reverses bone loss and enhances trabecular and cortical bone strength. Calcif Tissue Int 2006; 79:262-272.
111. Stanislaus D, Devanarayan V, Hock J. In vivo comparison of AP-1 gene activation in response to hPTH 1-34 and hPTH 1-84 in the distal femur metaphyses of young mice. Bone 2000; 27:819-826.
112. Kimmel DB, Bozzato RP, Kronis KA, Coble T, Sindry D, Kwong P, Recker RR. The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. Endocrinology 1993; 132:1577-1584.
113. Ejersted C, Andreassen TT, Oxlund H. Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone of rats. J Bone Miner Res 1993; 8:1097-1101.
114. Jolette J, Wilker C E, Doyle N, Hardisty JF, Metcalfe AJ; Marriott TB, Fox J, Wells DS. Defining a Noncarcinogenic Dose of Recombinant Human Parathyroid Hormone 1-84 in a 2-Year Study in Fischer 344 Rats Toxicologic Pathology 2006; 34:929–940.

115. John L. Vahle, Gerald G. Long, George Sandusky, Michael Westmore, Yanfei Linda Ma and Masahiko Sato. Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH(1-34)] are dependent on duration of treatment and dose. *Toxicol Pathol* 2004; 32:426.
116. Audran M, Chappard D, Legrand E, Libouban H, Basle M F. Bone microarchitecture and bone fragility in men: DXA and histomorphometry in humans and in the orchidectomized rat model. *Calcif Tissue Int* 2001; 69:214–221.
117. Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Halleen JM. Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 2008; 82:108–115.
118. Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1085-1098.
119. Vanderschueren D, Van Herk D, Sinker AMH, Visser WJ, Shot LPC, Bouillon R 1992 Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects on androgen deficiency. *Endocrinology* 1992; 130:2906-2916.
120. Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Morko J, Rasi S, Risteli J, Halleen JM 2008 Short-term changes in PINP predict long-term changes in trabecular bone in the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 2008; 82:155-161.